Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Ciencias Biológicas

Propagación *ex situ* de *Melocactus bellavistensis* Rauh & Backeb. (Cactaceae) mediante microinjerto de plántulas sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp.

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en Botánica

AUTOR

Jesús Franco DAMIAN VALDIVIA

ASESOR

Dra. Monica ARAKAKI MAKISHI

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Damian, J. (2022). *Propagación ex situ de Melocactus bellavistensis Rauh & Backeb. (Cactaceae) mediante microinjerto de plántulas sobre Pereskiopsis sp. y Opuntia sp.*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Jesús Franco Damian Valdivia
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	76406527
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-8037-1650
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Mónica Arakaki Makishi
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	08136445
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0003-1081-2507
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Miguel Machahua Gonzalez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	42826893
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Rafael Simon Oswaldo La Rosa Loli
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06134564
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Giovana Patricia Vadillo Galvez
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07268590
Datos de investigación	

Línea de investigación	A.1.4.2 Producción y Manejo de Recursos Terrestres
Grupo de investigación	Estudio de las Poblaciones Amenazadas de la Flora – FLORAM
Agencia de financiamiento	Perú. Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica - FONDECYT. CONCYTEC FONDECYT (PROCIENCIA)-Banco Mundial. 028-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Museo de Historia Natural (UNMSM) País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Jesús María Latitud: -12.077622 Longitud: -77.037202
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2019 - 2022
URL de disciplinas OCDE	Ciencias de las plantas, Botánica https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.10

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO CON MENCIÓN EN BOTÁNICA (MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)

Siendo las 10:00 horas del 15 de diciembre de 2022, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue https://meet.google.com/rrx-hsdm-wzo, y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo con mención en Botánica** de **JESÚS FRANCO DAMIAN VALDIVIA.**

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° **UNMSM-20220059582**, el titulando expuso su tesis: **PROPAGACIÓN *ex situ* DE *Melocactus bellavistensis* RAUH & BACKEB. (CACTACEAE) MEDIANTE MICROINJERTO DE PLÁNTULAS SOBRE *Pereskiopsis* sp. Y *Opuntia* sp.,** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota **19**, calificativo: **Aprobado con máximos honores**.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo con mención en Botánica** a **JESÚS FRANCO DAMIAN VALDIVIA** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 11:24 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 15 de diciembre de 2022.

Dr. MIGUEL MACHAHUA GONZALEZ
(PRESIDENTE)

Dra. MONICA ARAKAKI MAKISHI
(ASESORA)

Dr. RAFAEL LA ROSA LOLI
(MIEMBRO)

Mg. GIOVANA VADILLO GALVEZ
(MIEMBRO)

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INFORME DE EVALUACION DE ORIGINALIDAD

ESCUELA PROFESIONAL : CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIRECTOR DE LA ESCUELA PROFESIONAL : DR. PABLO SERGIO RAMÍREZ ROCA

OPERADOR DEL PROGRAMA INFORMATICO DE SIMILITUDES: Feedback Studio

DOCUMENTO EVALUADO* : **Propagación ex situ de *Melocactus bellavistensis* Rauh & Backeb. (Cactaceae) mediante microinjerto de plántulas sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp.**

AUTOR DEL DOCUMENTO** : DAMIAN VALDIVIA JESÚS FRANCO

FECHA DE RECEPCIÓN DEL DOCUMENTO : 27/octubre/2022

FECHA DE APLICACIÓN DEL SISTEMA INFORMATICO : 28/octubre/2022

SOFTWARE UTILIZADO :

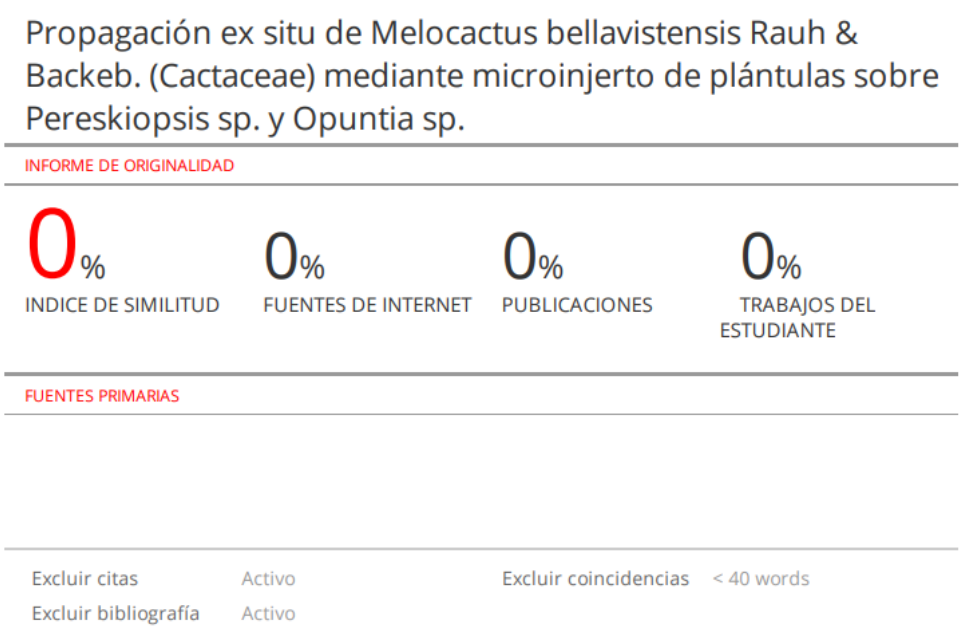
TURNITIN (X)
ITHENTICATE ( )
OTRO

CONFIGURACION DEL PROGRAMA DE SIMILITUDES

Excluye textos entrecomillados (X)
Excluye bibliografía (X)
Excluye cadenas menores a 40 palabras (X)
Otro criterio ( ) (especificar)

PORCENTAJE DE SIMILITUDES *** : CERO (0%)

FUENTES ORIGINALES DE LAS SIMILITUDES ENCONTRADAS **** :


Propagación ex situ de Melocactus bellavistensis Rauh & Backeb. (Cactaceae) mediante microinjerto de plántulas sobre Pereskiopsis sp. y Opuntia sp.

INFORME DE ORIGINALIDAD

0% INDICE DE SIMILITUD
0% FUENTES DE INTERNET
0% PUBLICACIONES
0% TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

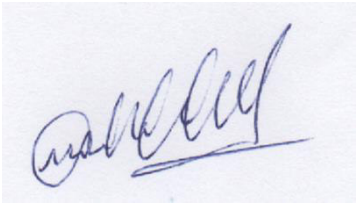
Excluir citas Activo
Excluir bibliografía Activo
Excluir coincidencias < 40 words

OBSERVACIONES: Ninguna

CALIFICACION DE ORIGINALIDAD:

Documento cumple criterios de originalidad sin observaciones (x)
Documento cumple criterios de originalidad con observaciones ( )
Documento no cumple criterios de originalidad ( )

FECHA DEL INFORME 28/octubre/2022



UNMSM
Firmado digitalmente por RAMIREZ ROCA Pablo Sergio FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 02.11.2022 12:31:58 -05:00

FIRMA DEL EVALUADOR

FIRMA DEL DIRECTOR EP

* Tesis para grado o título de pregrado
** Apellidos y nombres completos
*** En letras y números
**** Indicarlas en orden decreciente y su respectivo porcentaje

Dedicatoria

A mi familia y amistades

A mi querido Perú.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por su apoyo y ánimos durante mi formación personal y académica.

A Mónica Arakaki Makishi, por la confianza y oportunidades brindadas, y por su asesoría en lo académico y personal.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, a sus docentes, y las personas que conocí.

A cada integrante del Laboratorio de Sistemática y Diversidad Vegetal del Museo de Historia Natural, por su apoyo en las distintas etapas del desarrollo de esta tesis; en especial a Soledad Rivera Guillén, por sus comentarios y sugerencias en la redacción.

Por el financiamiento, agradezco al proyecto Banco de semillas de cactáceas para su conservación y restauración: aplicando tecnologías hortícolas y estudios de diversidad biológica para especies peruanas en riesgo de extinción, con número de contrato 028-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV.

ÍNDICE GENERAL

1 INTRODUCCIÓN 1

2 MARCO TEÓRICO 4

2.1 Familia Cactaceae 4

2.1.1 Generalidades 4

2.1.2 Estado de conservación 5

2.2 Género *Melocactus* 6

2.3 *Melocactus peruvianus* Vaupel 7

2.4 *Melocactus bellavistensis* Rauh & Backeb. 10

2.5 Propagación en el género *Melocactus* 12

2.5.1 Propagación sexual 12

2.5.2 Propagación asexual 14

2.6 Técnica de injerto de plántula o microinjerto 16

2.6.1 Definición 16

2.6.2 Origen y aplicación en diversos cultivos 17

2.6.3 Injertos y microinjertos en cactáceas 20

2.6.4 Compatibilidad injerto-portainjerto 21

2.6.5 Reguladores de crecimiento en el microinjerto 22

2.7 Selección de portainjertos 23

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 24

3.1 Hipótesis 24

3.2 Objetivos 24

3.2.1 Objetivo general 24

3.2.2 Objetivo específico 24

4 MATERIALES Y MÉTODOS 25

4.1 Permisos para investigación en cactáceas 25

4.2 Preparación de cámaras de cultivo 25

4.3 Ensayos preliminares 26

4.3.1 Selección de portainjertos 26

4.3.2 Germinación 28

4.4 Tallos de *Pereskiopsis* sp. como portainjertos 29

4.5 Cladodios de *Opuntia* sp. como portainjertos 33

4.6 Plántulas de *Melocactus bellavistensis* como microinjertos 35

4.7 Evaluación de germinación de *Melocactus bellavistensis* 36

4.8 Técnica de microinjertado de plántulas de *Melocactus bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. 39

4.9 Técnica de microinjertado de plántulas de *Melocactus bellavistensis* sobre *Opuntia* sp. 41

4.10 Variables, registro de resultados y análisis de datos 42

4.11 Seguimiento y mantenimiento del experimento 43

4.11.1 Actividades pre microinjertado 43

4.11.2 Actividades post microinjertado 45

5 RESULTADOS 49

5.1 Ensayos preliminares 49

5.1.1 Selección de portainjertos 49

5.1.2 Germinación 51

5.2 Evaluación de germinación de *Melocactus bellavistensis* 52

5.3 Sobrevivencia de microinjertos de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp. 57

5.4 Desarrollo de microinjerto de *Melocactus bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp 63

5.5 Crecimiento, en diámetro y altura, de microinjerto de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp. 70

6 DISCUSIÓN 73

6.1 Germinación de *Melocactus bellavistensis* 73

6.2 Microinjertos de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp. .75

6.2.1 Condiciones de cultivo 75

6.2.2 Tamaño del microinjerto y portainjerto 77

6.2.3 Desarrollo del microinjerto de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp. 78

6.2.4 Crecimiento, en diámetro y altura, del microinjerto de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp. 82

6.2.5 Diversidad para restauración, cultivo *in vitro* y reguladores de crecimiento 82

6.3 Dificultades y consideraciones durante el mantenimiento del experimento 84

7 CONCLUSIONES.....85

8 RECOMENDACIONES 86

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 87

10 ANEXOS 98

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características fisicoquímicas de los sustratos para siembra de *Pereskiopsis* sp., de acuerdo a su ficha técnica. **.....31**

Tabla 2. Tratamientos para evaluar la germinación de *Melocactus bellavistensis*. **.....37**

Tabla 3. Resumen de actividades pre microinjertado. **.....44**

Tabla 4. Resumen de actividades post microinjertado. **.....47**

Tabla 4. Resumen de actividades post microinjertado. **.....48**

Tabla 5: Germinación de *M. bellavistensis* en ensayos preliminares. **.....52**

Tabla 6: Germinación de *Melocactus bellavistensis* bajo distintos tratamientos de luz y temperatura. **.....53**

Tabla 7: Comparación de germinación, diámetro y altura de germinación bajo distintas fuentes de luz, con fotoperiodo 12 - 12**.....57**

Tabla 8: Sobrevivencia de microinjertos de *Melocactus bellavistensis* en cámara de cultivo MGC-350HP (niveles superior, medio e inferior). **.....62**

Tabla 9: Diámetro de microinjertos en cada evaluación. **.....71**

Tabla 10: Altura de microinjertos en cada evaluación. **.....72**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. *Melocactus peruvianus* en su hábitat. **9**

Figura 2. *Melocactus bellavistensis* en su hábitat. **11**

Figura 3. Injerto en cactáceas **16**

Figura 4. Cámaras de cultivo. **26**

Figura 5. Sustratos. **32**

Figura 6. *Pereskiopsis* sp. como portainjerto. **32**

Figura 7. *Opuntia* sp. como portainjerto. **34**

Figura 8. Semillas y plántula de *Melocactus bellavistensis*. **38**

Figura 9. Técnica de microinjertado de plántulas de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. **40**

Figura 10. Técnica de microinjertado de plántulas de *M. bellavistensis* sobre cladodios de *Opuntia* sp. **41**

Figura 11. Pruebas de injerto de *Melocactus* sp. **51**

Figura 12. Germinación de *Melocactus bellavistensis* bajos distintas temperaturas y fuentes de luz. **52**

Figura 13. Plántulas de *Melocactus bellavistensis* germinadas **56**

Figura 14. Sobrevivencia de microinjertos de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. **58**

Figura 15. Sobrevivencia de microinjertos de *M. bellavistensis* sobre *Opuntia* sp. **.....60**

Figura 16. Sobrevivencia de microinjertos de *Melocactus bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp. **.....60**

Figura 17. Ubicación de microinjertos de *M. bellavistensis* sobre *Opuntia* sp. a los 150 días después de microinjertado, y ampliación del microinjerto. **.....61**

Figura 18. Desarrollo de microinjertos exitosos de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. **65**

Figura 19. Desarrollo de microinjertos exitosos de *M. bellavistensis* sobre *Opuntia* sp. **65**

Figura 20. Desarrollo de microinjertos probablemente exitosos de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. **.....66**

Figura 21. Desarrollo de microinjerto probablemente exitoso de *M. bellavistensis* sobre *Opuntia* sp.**.....67**

Figura 22. Desarrollo de microinjertos no exitosos de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. **.....67**

Figura 23. Desarrollo de microinjertos no exitosos de *M. bellavistensis* sobre *Opuntia* sp. **68**

Figura 24. Desarrollo de más de un microinjerto de *M. bellavistensis* sobre *Opuntia* sp. **68**

Figura 25. Ensayos preliminares para evaluar el desarrollo de microinjertos de *M. bellavistensis*.....**69**

Figura 26. Diámetro de los microinjertos de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp.**.....70**

Figura 27. Altura de los microinjertos de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp.**.....71**

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Evaluación de población de *Melocactus bellavistensis*, en localidad tipo (distrito Bellavista, provincia Jaén, departamento de Cajamarca).....**98**

Anexo 2. Amenazas a poblaciones de cactáceas por comercio ornamental. **99**

Anexo 3. Pruebas preliminares de microinjertado de plántulas. **99**

Anexo 4. Día de inicio de experimento. **100**

Anexo 5. Mantenimiento de microinjertos en invernadero.....**100**

RESUMEN

La familia Cactaceae es endémica de América y la mayoría de sus especies están afectadas por actividades antrópicas como cambio de uso de suelo y extracción ilegal para comercio, sumando a esto el efecto del cambio climático. Para la conservación de su diversidad a nivel de especies y poblaciones, se plantea la propagación *ex situ* a partir de semillas, especialmente para especies que no se propagan vegetativamente por tallos, cladodios o hijuelos, como es el caso del género *Melocactus*; sin embargo, esto se dificulta por el lento crecimiento de las plántulas. En esta tesis se evaluó la efectividad de la técnica de microinjerto de plántulas de *Melocactus bellavistensis* sobre tallos de *Pereskiopsis* sp. (una plántula por portainjerto) y cladodios de *Opuntia* sp. (hasta doce plántulas por portainjerto) para incrementar su sobrevivencia y acelerar su crecimiento. Para obtener plántulas viables y manejables para microinjertar, se evaluó distintas fuentes de luz y temperatura. La técnica de microinjertado consistió en realizar un corte horizontal en el ápice de los portainjertos y en la base de las plántulas, para luego ubicar la plántula (ahora microinjerto) sobre un haz vascular visible. Se evaluó la sobrevivencia y crecimiento de los microinjertos por 260 días. El mejor tratamiento para obtener plántulas viables y manejables fue la germinación a 21 – 24 °C por más de 100 días con luz natural indirecta más luz artificial. Los microinjertos sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp. sobrevivieron un 32 y 6 %, respectivamente, para el día 30 después de microinjertado, manteniéndose el mismo porcentaje en las siguientes evaluaciones. Los microinjertos tuvieron un crecimiento sostenido de cerca de 4 mm, en diámetro y altura. Para el periodo de evaluación, se identificaron tres categorías de microinjerto: exitoso, probablemente exitoso y no exitoso; y cuatro etapas de desarrollo de un microinjerto exitoso.

Palabras clave: Cereeae, reproducción sexual, conservación, diversidad genética

ABSTRACT

The Cactaceae family is endemic to America, and most species in the family are affected by anthropogenic activities, such as land-use change and illegal extraction for trade, adding to this the effect of climate change. The work developed here aims to support the conservation of cactus diversity at the species and population levels, by means of *ex situ* propagation from seeds, particularly for species that are not usually propagated vegetatively using stems, cladodes or suckers, as is the case in the genus *Melocactus*; however, propagation by seeds is complicated by the slow growth of seedlings. We evaluated the effectiveness of the micrografting technique on *Melocactus bellavistensis* seedlings, using *Pereskiopsis* sp. (one seedling per plant) and cladodes of *Opuntia* sp. (up to twelve seedlings per plant) as rootstock to increase their survival and accelerate their growth. Different sources of light and temperature were evaluated in order to obtain viable and manageable seedlings for micrografting. The micrografting technique consisted in making a horizontal cut at the apex of the rootstocks and at the base of the seedling to, then place the seedling (now scion) on a visible vascular bundle. The survival and growth of scions was evaluated for 260 days. The best treatment to obtain viable and manageable seedlings was at a germination temperature of 21 – 24 °C for more than 100 days, and at indirect natural light plus artificial light. The scions on *Pereskiopsis* sp. and *Opuntia* sp. had a survival rate of 32 and 6 % respectively, 30 days after micrografting, maintaining the same percentage in the following evaluations. The seedlings kept a sustained growth of about 4 mm, in diameter and height. For the evaluation period, we identified three categories of micrografting: successful, probably successful, and unsuccessful, as well as four stages of development of a successful micrografted scion.

Keywords: Cereeae, sexual reproduction, conservation, genetic diversity

1 INTRODUCCIÓN

La familia Cactaceae es endémica de América y es un elemento importante en ecosistemas desérticos. Se le puede distinguir de otras plantas suculentas (entendiéndose la suculencia como la capacidad de acumular agua en diferentes partes de la planta, permitiéndole mantener al menos algunas actividades fisiológicas) por presentar areolas (yemas que pueden desarrollarse en flores, tallos, hojas o nuevas plantas) (Hunt & Taylor 1990; Barthlott & Hunt 1993; Anderson 2001).

Para la familia Cactaceae se han reportado aproximadamente 150 géneros y cerca de 1851 especies (Korotkova *et al.* 2021). Ubicándose los centros de mayor diversidad en Norteamérica, en el suroeste árido y semiárido de los Andes, y el este de Brasil (Barthlott & Hunt 1993). Además, también se reconocen como centros de endemismo la región caribeña y centro a noroeste de Chile (Oldfield 1997).

En Perú, la familia está representada por 42 géneros y 270 especies (Ostolaza 2019), sin embargo las clasificaciones se encuentran en constante revisión, por lo cual la cantidad de especies podría variar. Asimismo, se registran 199 endemismos distribuidos en 32 géneros (Arakaki *et al.* 2006).

La familia Cactaceae se subdivide en las subfamilias Pereskioideae, Opuntioideae Maihuenioideae y Cactoideae, dentro de esta última se encuentra la Tribu Cereeae, que presenta desde formas enanas hasta arborescentes (Nyffeler & Eggli 2010); cuenta con una gran diversidad en el este de Brasil y está conformada por 11 géneros, de los cuales 4 se presentan en Perú: *Cereus*, *Monvillea*, *Pilosocereus* y *Melocactus* (Ostolaza 2019). Para Perú, el género *Melocactus* presenta dos especies: *Melocactus peruvianus* Vaupel y *M. bellavistensis* Rauh & Backeb.; este último con dos subespecies: subsp. *bellavistensis* y subsp. *onychacanthus* (Taylor 1991). Las poblaciones del género

Melocactus, al igual que las demás cactáceas en Perú, están sometidas a distintas presiones como la pérdida de hábitat por cambio de uso de suelo, extracción de individuos de su hábitat natural para su comercio ornamental o medicinal y por efecto del cambio climático, por lo que requieren de mayores estudios que aporten a su conservación (Arakaki *et al.* 2006; Ostolaza 2019; Goettsch *et al.* 2015).

Se han realizado distintas evaluaciones sobre el estado de conservación del género *Melocactus*. Mediante el Decreto Supremo N° 043-2006-AG, se categorizó a *Melocactus peruvianus* en Situación Vulnerable (VU) pero no se mencionó a *M. bellavistensis*; mientras que la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN 2022), categoriza a *Melocactus peruvianus* en Preocupación Menor (LC) y a *Melocactus bellavistensis* en Datos Deficientes (DD).

Para mitigar las amenazas que sufren las poblaciones silvestres de cactáceas, la IUCN (Oldfield 1997) y el artículo 3 del Decreto Supremo No. 043-2006-AG tienen entre sus principales recomendaciones realizar evaluaciones de campo y establecer estrategias de conservación *ex situ* de las especies amenazadas. Una estrategia de propagación *ex situ* muy difundida para las cactáceas es el injerto de plántulas (provenientes de semillas) (Backeberg 1934). La propagación por injertos, permite acelerar el crecimiento vegetativo, y al usarse una plántulas en lugar de un esquejes se asegura el mantenimiento de la variabilidad genética; además, no requiere equipamiento especializado y es replicable. Sin embargo, en la literatura no se presentan casos de aplicación a mediana o gran escala de injerto de plántulas, sino de forma específica a ciertas especies y para generar una línea base de investigación como en *Notocactus submammulosus* (Shimomura & Fujihara 1978), en *Opuntia* spp. (Estrada-Luna *et al.* 2002) y *Pelecyphora aselliformis* (Badalamenti *et al.* 2016).

Durante evaluaciones en campo de poblaciones de *Melocactus peruvianus* y *M. bellavistensis* comprobamos que estas sufren distintas presiones antrópicas, siendo la más frecuente el cambio de uso de suelo, evidenciando que se requiere de mayores estudios para poder determinar el estado de conservación del género *Melocactus* en el Perú y para proponer medidas que mitiguen las presiones que sufren sus poblaciones.

Por lo anterior, se propone la propagación *ex situ* de *M. bellavistensis* mediante la técnica de microinjertado de plántulas sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp. como portainjertos, teniendo como objetivo propagar (manteniendo la diversidad genética) y acelerar el crecimiento de *M. bellavistensis*, mediante una técnica que no requiera equipamiento especializado para que pueda ser replicable con mayor facilidad. Por ello, se descartó la propagación vegetativa de *M. bellavistensis* porque es un cactus globoso que no genera ramificaciones y difícilmente se regenera al seccionarse; del mismo modo, se descartó la propagación clonal *in vitro* por requerir equipo especializado y posteriores etapas de aclimatación.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Familia Cactaceae

2.1.1 Generalidades

La familia Cactaceae es endémica de América, y está representada por 150 géneros y cerca de 1851 especies (Korotkova *et al.* 2021); si bien la familia está en constante revisión, por lo cual la cantidad de especies podría variar. Estas suelen ser asociadas a climas áridos; sin embargo, también se les puede encontrar en bosques lluviosos, como epífitas. Se les puede distinguir de otros grupos de suculentas, por presentar areolas. Las areolas son yemas axilares que pueden generar tallos, hojas, flores o inclusive una planta nueva. Las flores generalmente son bisexuales, ocasionalmente largas, solitarias y coloridas, poseen numerosos estambres, y en la corola se observa un cambio gradual de brácteas a sépalos y pétalos (Hunt & Taylor 1990; Barthlott & Hunt 1993; Anderson 2001).

Las cactáceas cuentan con tres centros de diversificación ubicados en Norteamérica (entre México y el suroeste árido de Estados Unidos), en el suroeste árido y semiárido de los Andes, y el este de Brasil (Barthlott & Hunt 1993). También se cuentan con pequeños centros de endemismo ubicados en “la región caribeña (incluyendo el norte de Sudamérica) y del centro al noroeste de Chile (especialmente los bordes occidentales del desierto de Atacama)” (Oldfield 1997).

Para Perú se registran 42 géneros que contienen 270 especies (Ostolaza 2019), de las cuales se registran 199 endemismos, distribuidos en 32 géneros (Arakaki *et al.* 2006).

Las distintas especies de cactáceas cumplen además roles ecológicos como refugios y fuente de alimento, entre otros. Además, la comunidad local suele emplear distintas especies de *Opuntia* spp. como cerco vivo, y se provechan lo frutos comestibles de

especies como *Hylocereus* spp. “pitahaya”, *Opuntia ficus-indica* “tuna” y *Corryocactus brevistylus* “sancayo”. Otro uso local importante es el religioso, como el de *Echinopsis pachanoi* “San Pedro”, que se reporta en cerámicas de culturas prehispánicas (como la cultura Chavín) y que se mantiene hasta la actualidad (Anderson 2001; Ostolaza 2019).

2.1.2 Estado de conservación

Las cactáceas, independientemente del país, comparten amenazas como la pérdida y degradación de su hábitat por actividades antrópicas extractivas o de cambio de uso de suelo, así como extracción de individuos para distintos propósitos comerciales; a esto se suman los efectos del cambio climático, agudizándose la amenaza cuando las poblaciones tienen una distribución restringida (Oldfield 1997; Goettsch *et al.* 2015; Ostolaza 2019; Breslin *et al.* 2020; Centeno-Alvarado *et al.* 2022).

Para Perú se reportan *Melocactus peruvianus* y *M. bellavistensis*, esta última con dos subespecies: *bellavistensis* y *onychacanthus* (Taylor 1991), las poblaciones de ambas especies están sometidas a distintas presiones, como la pérdida de sus hábitats por cambio de uso de suelo y extracción de individuos de su hábitat natural para su comercio ornamental o en medicina tradicional (Arakaki *et al.* 2006; Ostolaza 2019), esto último, comprobado durante la ejecución del presente trabajo. Estas amenazas se reflejan en el Decreto Supremo No. 043-2006-AG y en la categorización de la IUCN (2022).

La IUCN, principal autoridad mundial en la materia, propone que “las acciones para la conservación de plantas suculentas se implementen a nivel nacional y local, apoyándose en expertos locales”; para ello recomienda: mejorar las clasificaciones taxonómicas y de estados de conservación, mediante evaluaciones en campo, conservación *in situ* mediante el establecimiento de áreas protegidas, de forma que ayude a la conservación de especies en su hábitat natural; conservación *ex situ* coordinada; contar con una legislación nacional y controles comerciales efectivos para

las poblaciones de especies amenazadas, y educar a la población sobre la importancia de la conservación y aprovechamiento sostenible de las plantas suculentas (Oldfield 1997).

2.2 Género *Melocactus*

El género *Melocactus* es miembro de la subfamilia Cactoideae y tribu Cereeae. Durante el siglo XV, el actual género *Melocactus* fue denominado *Echinomelocactus* por los europeos que llegaron al Nuevo Mundo, esto en referencia al cefalio que generan estos cactus cuando desarrollan su etapa adulta; posteriormente, Joseph Pitton de Tournefort acorta el nombre a *Melocactus* y; en 1827, Heinrich Link y Christoph Otto describen formalmente el género *Melocactus*.

El género se caracteriza por presentar tallos globosos a cilíndricos, de menos de 1 m de altura, entre 8 a 27 costillas, verticales, no tuberculadas, 3 a 21 espinas, bien desarrolladas, poco diferenciadas, a veces en anzuelo, de coloración marrón claro a negro; los individuos adultos se distinguen por la presencia de un cefalio central formado de pelo, lana y cerdas de coloración blancas y rojizas; las flores se desarrollan en el cefalio, son tubulares, de color rojo a fucsia; los frutos maduran dentro del cefalio y emergen al madurar, tienen forma de clava, con poca pulpa, lisos, blancos, rojizos, rosados a fucsias; las semillas son globosas a ovoides, negras (Taylor 1991; Anderson 2001; Ostolaza 2019).

Se distribuyen en México, Centroamérica, el Caribe, Colombia, Venezuela, Ecuador, Brasil y Perú, registrándose más de 40 especies (Taylor 1991; Anderson 2001; Fernández-Alonso & Xhonneux 2002; Hunt *et al.* 2006; Salazar *et al.* 2019; Santos *et al.* 2020).

En el Perú, el género *Melocactus* cuenta con dos especies: *Melocactus peruvianus* Vaupel y *Melocactus bellavistensis* Rauh & Backeb. Esta última con dos subespecies:

bellavistensis y *onychacanthus* (Taylor 1991). Por otro lado, Wittner (2019) hace una breve mención a *Melocactus utcubambensis*, una especie de nombre dudoso, la cual posiblemente corresponde a *Melocactus bellavistensis.*

La actualización taxonómica más reciente del género *Melocactus* es dada por Taylor (1991), y distingue a *M. peruvianus* de *M. bellavistensis* de la siguiente manera:

> Costillas de 20-35 mm de alto, muy aguda y estrecha cerca del ápice del tallo; espinas centrales de hasta 17 mm, más cortas que las radiales (Loja Prov. Ecuador y cuenca del Río Marañón, al norte de Perú, 100 – 500 m) ..... *M. bellavistensis*
>
> Costillas de hasta 20 mm de alto, agudas pero amplias; espinas centrales de hasta 60 mm, ± igual de largas que las radiales (cuenca del Pacífico, El Oro prov. Ecuador & Perú, 0 -1270 m)..... *M. peruvianus*

2.3 *Melocactus peruvianus* Vaupel

Planta de tallo globoso-cilíndrico, a veces su diámetro tiende a ser más ancho en su base, de hasta 20 cm, con 8 a 16 costillas, espinas recta a curvas, radiales de 6 a 14, centrales 0 a 1, coloración desde marrón claro a negro; el cefalio tiende a no elongarse demasiado; flores fucsias insertas en el cefalio; frutos rojizos a rosados, que emergen del cefalio al madurar, con poco mucílago (Fig. 1). Las semillas son negras y circulares.

En el género *Melocactus*, la reproducción es exclusivamente por semilla y los tallos no se ramifican (Taylor 1991). En las poblaciones de *M. peruvianus* visitadas se observó al menos un individuo con un crecimiento “atípico”: formación de uno o más tallos globosos sobre el tallo principal, que llegan a madurar hasta formar cefalios (Figs. 1C y F).

Se las encuentra en suelo arenoso-rocoso con poca materia orgánica, generalmente acompañado de rocas medianas alrededor (Fig. 1).

Se distribuye a lo largo de la cuenca del pacífico, en el norte llegando hasta Ecuador a 03° 27’ 36.5’’ S y 80° 09’ 30.4’’ W (Salazar *et al.* 2019), en el sur hasta Arequipa – Perú a 15° 38’ 38’’ S y 73° 48’ 47.7’’ W a 1855 m (este estudio, colecta FD013, Figs. 1D - F).

Categorizada por la IUCN (2022) como de Preocupación Menor (LC).

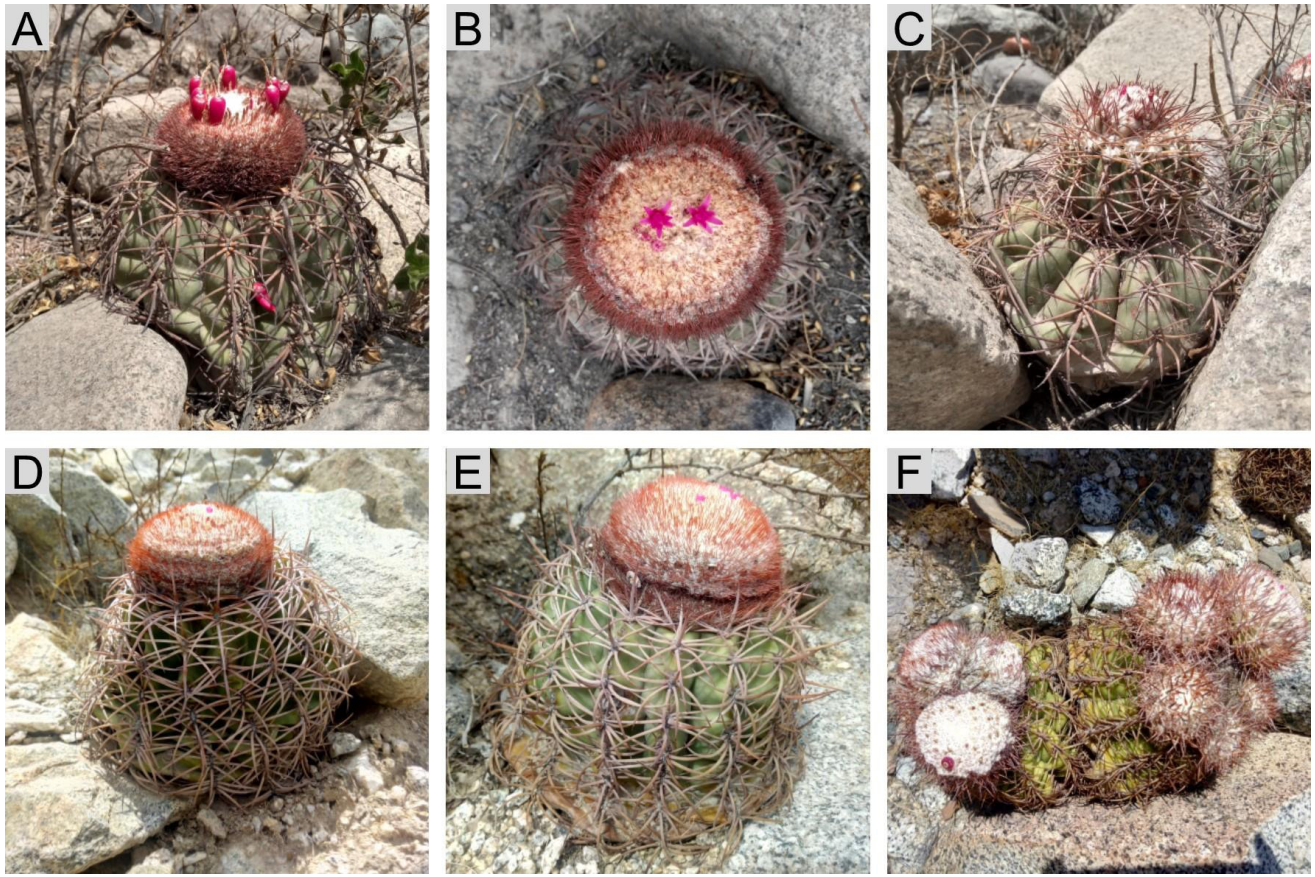


Figura 1. *Melocactus peruvianus* en su hábitat. A. Individuo adulto con cefalio desarrollado y frutos maduros. B. Individuo adulto con cefalio desarrollado, en floración. C. Individuo con daño en el ápice, formando un segundo crecimiento vegetativo y cefalio. D-E. Individuos adultos con cefalio desarrollado. F. Individuos formando más de un cefalio. A-C Matucana, Lima; D-F. Quilca, Arequipa.

2.4 *Melocactus bellavistensis* Rauh & Backeb.

Planta de tallo globoso a cilíndrico, sin contar el cefalio, puede llegar a 32 cm de alto y 24 cm de ancho, el cefalio puede medir hasta 17 cm de alto y 9.2 cm de ancho, se observa que cefalios de pocos centímetros de alto ya producen flores y frutos; costillas de 8 a 18, aunque se observa ocasionalmente hasta cuatro costillas en formación; espinas radiales de 6 a 8, no todas del mismo tamaño, grises a marrones, desde delgadas y quebradizas hasta gruesas y rígidas; espinas centrales 0 a 1; flores insertas en el cefalio, tubulares, fucsias; frutos en forma de clava, con poca pulpa, que emergen del cefalio al madurar (Fig. 2). Las semillas son ovoides, de color negro opaco.

De forma similar a las otras especies del género *Melocactus*, para *M. bellavistensis* solo se conoce su reproducción natural por semilla (Taylor 1991); ocasionalmente un tallo seccionado puede generar nuevos tallos vegetativos y hasta formar cefalios en estos (Figs. 2G - I), los cuales no se desprenden de la planta principal por lo cual no se considera propagación asexual. Esto se considera un crecimiento atípico, y se observó en al menos un individuo en las poblaciones visitadas; Basiuk (2013) propone que se puede originar por altas temperaturas durante su cultivo, esto en base a los casos que registra en los cactus cultivados en un invernadero.

Crece en suelos arcillosos a arenosos-pedregosos (Fig. 2).

Se distribuye en Cajamarca, Amazonas y en el valle del rio Mantaro. La localidad tipo es el distrito Bellavista, provincia Jaén, departamento de Cajamarca.

Categorizado por la IUCN (2022) como con Datos Deficientes (DD).

Taylor (1991) propone dos subespecies y las distingue de la siguiente manera:

Costillas 12 – 18, areolas de 2 – 5 mm de largo; espina central inconspicua o ausente (sur de Ecuador y norte de Perú) …… subsp. *bellavistensis*

Costillas 9 – 12, areolas de 4 – 13 mm de largo; 0 – 3 espinas centrales (norte de Perú) ……subsp. *onychacanthus*.



Figura 2. *Melocactus bellavistensis* en su hábitat. A. Localidad tipo impactada por cambio de uso de suelo. B-C. Individuos juveniles. D-F. Individuos adultos con cefalio desarrollado. G-I. Individuos con un segundo crecimiento vegetativo formando uno o

más cefalios en un individuo. A-I. Distrito Bellavista, provincia Jaén, departamento de Cajamarca.

2.5 Propagación en el género *Melocactus*

La reproducción en este género es exclusivamente mediante semillas (Taylor 1991). En la visita a la localidad tipo de *Melocactus bellavistensis* se reconoció las distintas etapas de desarrollo, desde plántulas de menos de 1 cm de diámetro e individuos juveniles (Figs. 2B y D), hasta individuos adultos con cefalios de pocos centímetros hasta de 17 cm que producen flores y frutos (Figs. 2D – F). En los casos donde hubo regeneración del tallo principal (Figs. 2G - I), los "nuevos tallos" se mantienen unidos al tallo principal por lo cual no se considera como propagación, pero pueden generar nuevos cefalios.

2.5.1 Propagación sexual

Los requerimientos para la germinación en el género *Melocactus* son variados. A continuación se presenta un resumen respecto al fotoperiodo, temperatura, tipo de luz, sustrato y sobrevivencia.

Al evaluar fotoperiodo de 12 horas, para *Melocactus bahiensis* y *M. violaceus*, se obtuvieron entre a 13 a 66 % de germinación (Lone *et al.* 2007; Zamith *et al.* 2013), y para *Melocactus conoideus, M. sergipensis, M. violaceus* y *M. zehntneri*, reportaron entre 20 a 90% de germinación (Rebouças & Santos 2008; Santos *et al.* 2020). Mientras que en ausencia de luz, solo se reportó germinación de *M. violaceus* siendo menor al 20% (Santos *et al.* 2020).

En cuanto a la temperatura, para *M. violaceus,* se evaluó rangos de 20 a 35 °C y 25 a 37 °C, y temperaturas fijas de 25 y 35 °C registrándose porcentajes de germinación de 66.5 ± 18.8, 62.5 ± 17.9, 8 ± 1.6 y 10% respectivamente, siendo más favorables los rangos de temperatura (Zamith *et al.* 2013). Por otro lado, para la germinación de *M.*

bahiensis, el mayor porcentaje de germinación, de 45 a 48%, se observó a una temperatura fija de 25 °C, mientras que a 20 °C fue de 17 a 21%, y a 30 °C de 13 a 14% de germinación (Lone *et al.* 2007).

Cuando se evaluaron distintos tipos de luz para la germinación de *M. conoideus* con temperaturas entre 23 a 25 °C, se obtuvo entre el 40 y 90% de germinación, dependiendo principalmente del tipo de luz empleada (Rebouças & Santos 2008). Mientras que cuando se evaluó la germinación *in vitro* de *M. sergipensis*, *M. violaceus* y *M. zehntneri* en cámara de cultivo con luz artificial o en invernadero con 20% de luz natural, con luz natural se obtuvieron mejores resultados en la germinación, mayor acumulación de biomasa y mayor supervivencia (Santos *et al.* 2020).

De los trabajos anteriormente mencionados, se puede inferir que para el género *Melocactus* se requiere de luz para la germinación, la temperatura mínima para su germinación es de 20 °C y, a pesar de que *M. bahiensis*, *M. conoideus* y *M. violaceus* tienen una distribución cercana, en el este de Brasil, pueden tener distintos requerimientos para una germinación óptima. Por lo cual, para esta tesis, se requirieron de evaluaciones preliminares para determinar las condiciones óptimas para la germinación de *M. bellavistensis*.

Respecto al sustrato para la germinación de *M. bahiensis*, al evaluar arena y papel filtro no se encontró diferencias estadísticas significativas (Lone *et al.* 2007).

En evaluaciones de supervivencia de plántulas de *M. peruvianus*, menores de 15 semanas de edad, se encontró que estas tienen un 90% de probabilidad de supervivencia si se les mantiene en ambiente sombreado (usando 4 capas de malla verde mosquitero), frente a 40% de probabilidad sin sombra (Castro Cepero *et al.* 2006).

2.5.2 Propagación asexual

El cultivo *in vitro* de tejidos de cactáceas se ha propuesto como alternativa para su conservación, recuperación o disminución de la presión en las poblaciones silvestres (Rubluo *et al.* 1993; Song *et al.* 2021).

Así, se ha logrado la propagación *in vitro* de cactáceas comerciales mediante el cultivo de tejido joven proveniente de plantas maduras, como en *Hylocereus undatus* (Mohamed-Yasseen 2002). Otras técnicas incluyen la regeneración por organogénesis indirecta (cuando se forma un callo del cual se regeneran nuevos explantes) o directa (cuando no se requiere de la formación de callo). Se ha reportado la organogénesis directa de *Opuntia lanígera* a partir de areolas (Estrada-Luna *et al.* 2008), y para *Opuntia ficus-indica*, se reporta la regeneración mediante organogénesis indirecta, obteniéndose plantas sin variaciones morfológicas respecto a la altura y tamaño de cladodios (Angulo-Bejarano & Paredes-López 2011), lográndose también establecer protocolos de propagación y aclimatación (El Finti *et al.* 2013).

Por otro lado, en cactáceas de interés ornamental como *Coryphantha elephantidens* se logró regenerar, enraizar y aclimatar nuevas plantas a partir de explantes de plantas en cultivo (Bhau & Wakhlu 2015). En *Coryphantha minima* y *Obregonia denegrii* se logró la propagación empleando plántulas germinadas *in vitro* como explantes (Malda *et al.* 1999). Otras, como *Escobaria minima*, *Mammillaria pectinifera* y *Pelecyphora aselliformis*, se lograron regenerar de diferentes tipos de explantes, aunque en ocasiones generándose formación de callo o hiperhidricidad (Giusti *et al.* 2002). Recientemente, Song *et al.* (2021), además de definir un protocolo de propagación para *Mammillaria herrerae*, también reportan los distintos compuestos que se generan en los brotes y callos.

Se ha reportado la propagación *in vitro* de *Melocactus glaucescens* empleando plántulas de 200 días, donde se obtuvieron nuevos brotes con o en ausencia de reguladores de crecimiento. Sin embargo, se detectaron variaciones genéticas cuando no se usaron reguladores de crecimiento, y en algunas combinaciones de 6-bencilaminopurina y ácido naftalenacético se observaron variaciones morfológicas en la forma del tallo, patrón de espinas e hiperhidrosis; las cuales no se observaron cuando se aplicó kinetina y ácido naftalenacético (Torres-Silva *et al.* 2018). En otro caso, se evaluó la reversión de madurez del tejido ubicado en la base del cefalio de *Melocactus matanzanus* mediante aplicación de reguladores de crecimiento para la generación de nuevo brotes, y aunque se lograron algunos brotes estos tuvieron características atípicas (Wyka 2007).

Si bien la propagación *in vitro* clonal logra producir un alto número de individuos a partir de poco material vegetal, estos, al ser clonales, no van a representar la diversidad genética de una población, y en ocasiones pueden generarse variaciones genéticas o morfológicas durante los ciclos de cultivo. Por lo anterior, no se recomendaría para programas de repoblación o cuando se requiera conservar la diversidad genética poblacional. Esto no es un problema en la propagación *in vitro* por semillas (sexual), sin embargo las plantas propagadas requerirían de un proceso de aclimatación. En ambos casos, la propagación *in vitro* no va acorde al objetivo de esta tesis, la cual es propagación manteniendo diversidad genética, acelerar el crecimiento y a un bajo costo.

Por otro lado, la propagación *in vitro* podría emplearse para rescatar especies en peligro crítico, producción de metabolitos secundarios y suplir la demanda ornamental de especies o cultivares (Estrada-Luna *et al.* 2008; El Finti *et al.* 2013; Civatti *et al.* 2017; Torres-Silva *et al.* 2018; Song *et al.* 2021; Santos-Díaz *et al.* 2022).

La técnica de microinjertar plántulas de *Melocactus* sp. para acelerar su crecimiento ya había sido mencionada por Backeberg (1934); sin embargo, no dio detalles sobre el tipo de portainjerto empleado o los porcentajes de éxito.

2.6 Técnica de injerto de plántula o microinjerto

2.6.1 Definición

El término “injerto” hace referencia al material vegetal que se une mecánicamente a otra planta denominada “portainjerto” o “patrón” para formar un nuevo individuo. El injerto suele proporcionar la sección aérea del nuevo individuo, mientras que el portainjerto la estructura radicular. Se denominará “microinjerto” cuando el material vegetal a injertar es una sección de una plántula o meristemo, con pocos o ningún primordio foliar, y de menos de 5 mm. El portainjerto se suele obtener al decapitar el ápice de una plántula germinada, este procedimiento se puede realizar *in vitro* o en un medio aséptico (Navarro *et al.* 1975; Edriss & Burger 1984). En cactáceas, el portainjerto es por lo general una planta adulta, con una sección aérea fotosintética que aporta con nutrientes al crecimiento del injerto o microinjerto (Fig. 3).

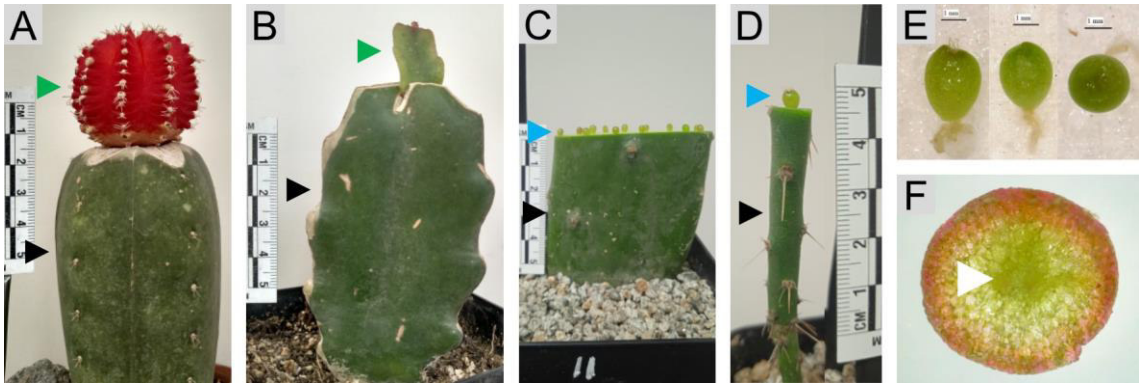


Figura 3. Injerto en cactáceas. A. Injerto de *Gymnocalycium mihanovichii* variegado sobre *Echinopsis pachanoi*; B. Injerto de *Schlumbergera* sp. sobre *Hylocereus* sp.; C. Microinjertos de *Melocactus bellavistensis* sobre *Opuntia* sp.; D. microinjerto de *M.*

bellavistensis sobre *Pereskiopsis* sp. E. Plántulas de *M. bellavistensis* para microinjertar; F. Sección transversal de plántula de *M. bellavistensis*, punta de flecha indica haz vascular. Color de puntas de flecha: negro (portainjerto), verde (injerto) y celeste (microinjerto).

Se considera que la técnica de microinjertado ha sido exitosa cuando el microinjerto se unió al portainjerto y además logra crecer (en tamaño) y desarrollar (con características de un individuo típico). Para lograr esto es muy importante la fuente del microinjerto y la técnica aplicada, pudiendo ser esta última en forma de letra V u horizontal (Conejero *et al.* 2013; Córdova-Risco *et al.* 2017); además, asegurar un buen contacto entre el injerto y el portainjerto es esencial para el éxito de la técnica (Wu *et al.* 2007), para que se forme tejido de unión entre ambas plantas. También son determinantes las condiciones ambientales en los días siguientes al microinjertado, como contar con humedad alta para evitar que el microinjerto se seque, y evitar corrientes de aire o movimientos bruscos en las plantas para evitar que el microinjerto se desprenda.

2.6.2 Origen y aplicación en diversos cultivos

La técnica de microinjertado fue inicialmente aplicada para obtener plantas de cítricos libres de virus (Navarro *et al.* 1975), y sigue aplicándose con este fin en distintos cultivos, por ejemplo Conejero *et al.* (2013) lograron eliminar dos virus y un viroide en cerca del 100% de plantas microinjertadas de *Prunus* spp.

En los primeros registros de microinjerto en cítricos se comprobó que el porcentaje de éxito dependía de la **edad del portainjerto** (siendo los más exitosos los de 2 semanas de edad con 37.5% de injertos prendidos, aunque también tuvieron mayor incidencia de formación de callos; los portainjertos de mayor edad no prosperaron porque los microinjertos se secaron u oxidaron y esto se asoció a la falta de humedad; mientras

que en los portainjertos más jóvenes los microinjertos tendieron a estar inactivos e insertos en el callo formado por el portainjerto), las **variedades injertadas** (cuando se probó sobre el mismo tipo de portainjerto), del **número de primordios foliares** que acompañaron el meristemo (siendo 6 primordios foliares el mayor número evaluado y el más eficaz con 47.3% de éxito), la **posición del injerto** sobre la superficie decapitada del portainjerto (siendo la posición del injerto sobre el anillo vascular del portainjerto decapitado horizontalmente el tratamiento más exitoso, con un 50% de éxito), las **condiciones de germinación** del portainjerto (obteniéndose un 37.5% de prendimiento cuando se usaron patrones provenientes de semillas germinadas en oscuridad frente al 2.7% de prendimiento en semillas germinadas con 1000 lux con fotoperiodo de luz-oscuridad de 16-8 horas) y, la **luminosidad** que fue necesaria para el prendimiento, sin observarse diferencia entre 300 a 10000 lux por lo cual se estableció 1000 lux y 16 horas al día como estándar (Navarro *et al.* 1975).

Por otro lado, respecto a la **posición del injerto**, Edriss & Burger (1984) reportaron un mayor porcentaje de éxito (27.7 - 46.6%) cuando el injerto de cítricos se colocó en el córtex del portainjerto, en una incisión en forma de T invertida, en contraste con el 15.5 - 16.9% de éxito cuando el injerto se colocó sobre el cambium vascular del portainjerto. Sin embargo, Jonard *et al.* (1983) ubica el injerto en contacto con la zona del cambium en el anillo vascular sobre la superficie decapitada del portainjerto y Conejero *et al.* (2013) aplican la misma metodología para la propagación de plantas de *Prunus* sp. libres de virus. Esto probablemente debido a la mayor facilidad para usar patrones decapitados horizontalmente, en contraste con la inserción en T invertida.

Entre las características favorables de esta técnica están la de requerir poco material vegetal, ser adaptable a distintos cultivos y generalmente no requerir de reguladores de crecimiento, lo que es muy importante para reducir costos a la hora de usar esta técnica a gran escala (Mondal *et al.* 2005).

Esto ha hecho que la técnica sea aplicada a otros cultivos para distintos fines, teniéndose el mayor número de experiencias de microinjertos en frutales. En *Amygdalus communis* "almendra" cultivar Nonpareil, se usó semillas silvestres germinadas *in vitro* como portainjertos y brotes apicales o subapicales del cultivar Nonpareil fueron usados como microinjertos (Kalan *et al.* 2011). En *Annona cherimola* "chirimoya", la técnica de microinjerto mejoró el enraizamiento y la aclimatación de los brotes (Padilla & Encina 2011). En *Camellia sinensis* se disminuyó a la mitad el periodo de maduración para su traslado de invernadero a campo (Mondal *et al.* 2005). Mientras que en *Pouteria lucuma*, microinjertos *in vitro* y *ex vitro* dieron resultados estadísticamente similares (Córdova-Risco *et al.* 2017).

Una variante de la técnica de microinjertos es cuando el corte en el portainjerto es en forma de letra "V", esta fue usada con éxito por Cortizo *et al.* (2004) para *Pinus pinea,* alcanzando el 43% de éxito en los microinjertos realizados. Del mismo modo, Córdova-Risco *et al.* (2017) lograron establecer un protocolo de micropropagación de *Pouteria lucuma,* y Wu *et al.* (2007) aplicaron la técnica de microinjerto en forma de "V" para completar la fase de enraizamiento de propagación *in vitro* de *Protea cynaroides*.

La estación del año también influye en el éxito de la técnica de microinjertado. Para *Camellia sinensis*, los injertos realizados a principios del verano se establecieron relativamente más rápido y con una alta tasa de éxito (Prakash *et al.* 1999). Para *Pinus radiata,* la estación en la que fue colectado el microinjerto influyó, siendo los colectados en otoño más exitosos que los colectados en verano, en cuanto a establecimiento y consolidación (Materán *et al.* 2008). De forma similar, para *Pinus pinea*, donde los microinjertos colectados en mayo y julio mostraron un mejor establecimiento y desarrollo estadísticamente significativo con respecto a los colectados de febrero a abril (Cortizo *et al.* 2004).

2.6.3 Injertos y microinjertos en cactáceas

Uno de los primeros trabajos en los cuales se aplicó la técnica de microinjerto para la propagación de cactus fue el de Shimomura & Fujihara (1978), quienes probaron microinjertar de forma horizontal plántulas de *Notocactus submammulosus* var. *pampeanus* de 2 mm de diámetro sobre *Hylocereus trigonus*, enraizados, de 10 cm de largo, mantenidos a 25 °C. Evaluaron el porcentaje de injertos donde se formaron conexiones de los haces vasculares cuando sus superficies estuvieron en contacto, pero en distintas posiciones.

Por otro lado, cuando se probaron las técnicas de microinjerto por "corte horizontal" y en forma de letra "V" en *Opuntia* spp., los de corte horizontal fueron estadísticamente más exitosas que los de forma de letra "V" con un 90 y 30% de viabilidad respectivamente; además, en los microinjertos horizontales no se observaron problemas en la unión del microinjerto/portainjerto cuando las superficies de contacto fueron perfectamente lisas, mientras que en los microinjertos en forma de letra "V" hubo problemas de coincidencia de tejidos y oxidación de los tejidos expuestos al aire en la zona de unión (Estrada-Luna *et al.* 2002). Esto concuerda con Materán *et al.* (2008), que reportan la oxidación de los tejidos como una causa de inviabilidad de los microinjertos. Esto indicaría que el tipo de microinjerto recomendado, por "corte horizontal" o en forma de letra "V", va a depender del tipo de planta a injertar.

En injertos de cactus globosos, como *Gymnocalycium mihanovichii*, sobre tallos de *Echinopsis* sp. o *Hylocereus* sp. se realiza un corte horizontal para cortar un área mínima en la base del injerto y para aumentar el área de contacto entre el injerto y portainjerto.

2.6.4 Compatibilidad injerto-portainjerto

Para frutales injertados, Feucht (1988) denomina incompatibilidad al "fenómeno de senescencia prematura causada por procesos fisiológicos y bioquímicos, descartando como causa fallos atribuidos a enfermedades".

Estrada-Luna *et al.* (2002) determinaron las etapas de formación de unión entre el injerto y portainjerto "(1) desarrollo de una capa necrótica, (2) formación de callo en el lugar de contacto del injerto con el portainjerto, (3) diferenciación de un nuevo cambium vascular, (4) restauración del tejido vascular y (5) restauración de la continuidad de la epidermis en la zona de unión del injerto con el portainjerto".

El tiempo necesario para que se completen estas cinco etapas es muy variable. Para *Notocactus submammulosus* var. *pampeanus,* de una semana de germinados, microinjertados sobre *Hylocereus trigonus,* se observó a los 20 días (Shimomura & Fujihara 1976), mientras que para los microinjertos de *Opuntia* spp. sobre *Opuntia* spp., se observó el restablecimiento del crecimiento del injerto a los 24 días en los microinjertos exitosos y el establecimiento de continuidad de los haces vasculares a los 28 días de microinjertado (Estrada-Luna *et al.* 2002),

El grado de adaptación entre el injerto y el portainjerto va a depender de su plasticidad para actuar en simbiosis forzada (Feucht 1988). Por ejemplo, mientras los heteroinjertos entre *Nicandra* y *Lycopersicon* nunca lograron formar continuidad vascular y solo pudieron ser mantenidos en un ambiente con humedad mayor a 80%, los heteroinjertos de *Datura* y *Lycopersicon* sí lograron desarrollarse por un periodo largo de tiempo mostrando continuidad vascular a los 4 días después del microinjerto (Yeoman & Brown 1976).

2.6.5 Reguladores de crecimiento en el microinjerto

Cuando se probó la aplicación de reguladores de crecimiento en microinjertos de *Citrus*, Edriss & Burger (1984) reportaron que sumergir el microinjerto en ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (10mg/L) o kinetina (1 mg/L) por 5-10 minutos genera porcentajes de éxito con 74.4 ± 7.8 y 75.7 ± 2.1%, respectivamente, frente al 30.1 ± 6.3% del control agua.

Para microinjertos horizontales de *Notocactus submammulosus* var. *pampeanus* sobre *Hylocereus trigonus*, cuando se aplicó al microinjerto una gota (5 µL) de 100 ppm de 1-ácido naftalenacético a los 3, 6 y 9 días de injertado, el porcentaje de injertos donde se formaron conexiones de los haces vasculares fue mayor al 90% y disminuye a 47 y 18% si se aplica a los 20 y 40 días respectivamente (Shimomura & Fujihara 1978).

Por otro lado, para injertos de cítricos, se ha reportado que cuando se sumergió por 5 segundos el ápice decapitado del portainjerto en soluciones de benciladenina, de 0 a 1 mg/L o ácido indolbutírico, de 0 y 1 mg/L, con frecuencia los microinjertos estaban vivos pero sin crecimiento después de tres semanas y, no crecieron aun cuando se les aplicó 20mg/L de ácido giberélico (Navarro *et al.* 1975). Para *Protea cynaroides*, el éxito del control fue estadísticamente mayor al de los dos tratamientos (remojo de microinjertos en 100 mg/L de ácido ascórbico y 150 mg/L de ácido cítrico durante 10 min, o adición de una capa de medio Murashige & Skoog (MS) solidificado alrededor del área del injerto) (Wu *et al.* 2007). En *Camellia sinensis*, cuando se microinjertó sin aplicar reguladores de crecimiento se obtuvo de 92 al 98% de supervivencia, se disminuyó de 12-18 a 6-8 meses el periodo de maduración para su traslado de invernadero a campo y la talla de las plantas injertadas fue mayor al de las no injertadas (Mondal *et al.* 2005).

Por lo tanto, se puede concluir que la eficiencia de la aplicación de reguladores de crecimiento en microinjertos depende de muchos factores, como la especie, concentración, frecuencia de aplicación, entre otros.

En esta tesis se decidió no emplear reguladores de crecimiento.

2.7 Selección de portainjertos

Backeberg, ya en 1934, mencionaba que injertar plántulas de *Melocactus* sp. aceleraba su crecimiento, aunque no hizo mención de los portainjertos empleados. En otro reporte de injertos *ex vitro* de cactáceas se menciona el uso de plántulas de *Notocactus submammulosus* var. *pampeanus* como injertos, sobre *Hylocereus trigonus* como portainjerto (Shimomura & Fujihara 1978), también se reporta el injerto de tallos de *Hylocereus* sp. como injerto y portainjerto para evaluar la tolerancia a altas temperaturas (Tomaz de Oliveira *et al.* 2021); mientras que en un ambiente *in vitro*, se han injertado meristemos de *Pelecyphora aselliformis* sobre secciones de tallo de plántulas de *Opuntia ficus-indica* (Badalamenti *et al.* 2016), también se han evaluado homo y heteroinjertos en distintas especies de *Opuntia* sp. (Estrada-Luna *et al.* 2002). Además, registros propios durante el desarrollo del presente trabajo incluyen a *Mammillaria* sp. y *Gymnocalycium* sp. injertados sobre *Echinopsis* sp. e *Hylocereus* sp.

Si bien estos antecedentes reportan el uso de *Hylocereus* sp., *Opuntia ficus-indica* y *Echinopsis* sp. como portainjertos, se requirió de ensayos preliminares para elegir los portainjertos más apropiados para este experimento. Estos se desarrollan en la sección 4.3 Ensayos preliminares.

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La sobrevivencia y desarrollo vegetativo de plántulas de *Melocactus bellavistensis* se incrementa al ser injertadas tanto sobre *Pereskiopsis* sp. como sobre *Opuntia* sp.

Variables

- Independiente: Temperatura, humedad y tiempo de evaluación.
- Dependientes: sobrevivencia del microinjerto, crecimiento del microinjerto (altura y diámetro mayor) y estadíos de desarrollo del microinjerto.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

Generar un protocolo para la propagación *ex situ* de *Melocactus bellavistensis* mediante la técnica de microinjerto de plántulas.

3.2.2 Objetivo específico

- Evaluar la efectividad de la técnica de microinjertado de plántulas de *Melocactus bellavistensis* sobre dos tipos de portainjertos: *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp.
- Definir las etapas de adaptación y desarrollo del microinjerto de *Melocactus bellavistensis* sobre portainjertos de *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp.
- Determinar las condiciones bióticas y abióticas óptimas para el microinjertado exitoso de *Melocactus bellavistensis* sobre portainjertos de *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Permisos para investigación en cactáceas

Se solicitó al Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR) una Autorización de investigación y colecta de flora fuera de Áreas Naturales Protegidas por el Estado (otorgada mediante Resolución de Dirección Ejecutiva N° AUT-IFL-2019-074), y a la Administración Técnica, Forestal y de Fauna Silvestre (ATFFS) - Lima, una autorización para el establecimiento de un Centro de Propagación en el Museo de Historia Natural de la UNMSM (otorgada mediante Resolución de Dirección Ejecutiva 15-LIM/CP-V-2019-003).

4.2 Preparación de cámaras de cultivo

Se construyeron cuatro **cámaras húmedas** (Figs. 4A y B) para el cultivo de las plantas, con el objetivo de brindar un ambiente de mayor humedad y temperatura que el exterior (en la primavera-verano del 2020-2021, en el interior de la cámara la humedad fue de 60 a 90 % y la temperatura de 25 a 33 °C, mientras que en el exterior de la cámara la humedad fue de 40 a 60 % y la temperatura de a 19 a 28 °C), además de cubrirlas de corrientes de viento o daños mecánicos. Las cajas constaron de un armazón de madera y cubierta de plástico grueso especial para invernaderos, con dimensiones: 170 cm de largo x 80 cm de ancho x 60 cm de alto (Fig. 4A), considerando el tamaño de los portainjertos y el número de plantas a evaluar. Estas cámaras húmedas se emplearon cuando la temperatura ambiental fue mayor a 20 °C, principalmente para el enraizamiento y propagación de portainjertos.

También se empleó una **cámara de cultivo** MGC-350HP (Fig. 4C), para mantener la humedad a 60 % y temperatura a 25 ± 1 °C. Se empleó esta cámara de cultivo cuando la temperatura ambiente fue menor a 20 °C.



Figura 4. Cámaras de cultivo. A. Cámara húmeda, vista exterior. B. Cámara húmeda, vista interior, con cultivo de *Pereskiopsis* sp. C. Cámara de cultivo MGC-350HP.

4.3 Ensayos preliminares

4.3.1 Selección de portainjertos

Para seleccionar los portainjertos más apropiados se realizaron pruebas preliminares de injertado y microinjertado con tallos enraizados de *Echinopsis pachanoi*, *Pereskiopsis* sp., *Opuntia* sp. e *Hylocereus* sp.

Para *E. pachanoi*, se injertaron tres individuos juveniles de *M. bellavistensis* de 4 cm de diámetro (colectados en Jaén, Cajamarca) sobre tallos de *E. pachanoi*. Para esto, en cada tallo enraizado de *E. pachanoi* (portainjerto) se realizó un corte transversal a 2 cm del ápice del tallo y un corte en diagonal en el borde superior de cada costilla, luego se realizó otro corte transversal fino para dejar una película de tejido que evite la desecación en el área de corte; en los individuos juveniles de *M. bellavistensis* (injertos)

se realizó un corte transversal a 1 cm sobre su raíz principal. Inmediatamente, se retiró la película de tejido del portainjerto y se ubicó el injerto sobre este; de forma que los haces vasculares del injerto (concentrados en un círculo) se ubicaran en contacto con el anillo vascular del portainjerto. Luego se sujetó ambas plantas con cinta adhesiva por dos semanas.

En los siguientes ensayos; debido a que se microinjertó plántulas, por su pequeño tamaño no se recomienda colocar ningún soporte o cinta para sujetarlo al portainjerto, sino evitar movimientos bruscos que puedan moverlo o retirarlo, y mantenerlos a más de 80 % de humedad.

Para *Pereskiopsis* sp., se usaron ramas enraizadas jóvenes de *Pereskiopsis* sp. de 15 cm (con ápice) aclimatadas en la cámara húmeda. Se les decapitó a 1 cm del ápice mediante un corte fino horizontal, luego se realizó otro corte fino paralelo y se dejó este último disco de tejido sobre el corte para evitar la pérdida de humedad. También se retiraron las hojas y espinas hasta 2 cm por debajo del corte. Luego, la plántula de *M. peruvianus* a microinjertar fue cortada horizontalmente 1 mm sobre el inicio de la raíz (a partir de ese momento a este material vegetal se le denominará **microinjerto**) y se mantuvo sobre la hoja de bisturí para evitar que el corte se seque. Inmediatamente, se retiró el disco de tejido (dejado anteriormente sobre el ápice decapitado del portainjerto) y se deslizó el injerto sobre la superficie decapitada del portainjerto, ubicando el centro del microinjerto sobre el haz vascular de mayor diámetro del portainjerto.

Para *Opuntia* sp., se seleccionó una de cladodios de 10 a 15 cm de largo y hasta 7 cm de ancho, esto para poder mantener una alta densidad de cultivo; y además, se eligió una con muy pocas espinas y gloquidios, para facilitar su manejo en cultivo. Se emplearon cladodios jóvenes y enraizados que habían desarrollado en la última temporada. La técnica de microinjertado fue similar a las pruebas realizadas en

Pereskiopsis sp., con la particularidad que el disco fino que se deja luego de hacer el corte transversal en el portainjerto es de mayor área. En este caso se injertaron hasta 6 plántulas de *M. peruvianus* por portainjerto.

Para *Hylocereus* sp., se emplearon plántulas de 4 a 6 cm de largo, obtenidas de germinar semillas de un fruto comercial. Se decapitó el portainjerto a 0.5 cm del ápice, se hizo un corte diagonal en el borde superior de cada costilla, un corte longitudinal a lo largo del borde de cada costilla (para retirar las areolas) y un corte transversal fino para dejar una película de tejido en el portainjerto. Luego, en la plántula de *M. bellavistensis* (microinjerto) a microinjertar se hizo un corte horizontal a 1 mm sobre el inicio de la raíz, y se colocó de forma concéntrica sobre el portainjerto (debido a que ambos tienen haces vasculares concentrados en un círculo).

4.3.2 Germinación

Considerando lo reportado en estudios previos sobre germinación de semillas de *Melocactus* sp. (Rebouças & Santos 2008; Zamith *et al.* 2013), se probó el efecto del fotoperiodo, uso de agua destilada y peróxido de hidrógeno 5% como escarificante.

Para la obtención de plántulas de *M. bellavistensis* se evaluó la germinación de 120 semillas por cada placa Petri de 100 x 15 mm, sobre papel filtro permanentemente saturado de agua destilada o peróxido de hidrógeno 5%, con un fotoperiodo de luz-oscuridad de 12-12 o 0-24, y a temperatura ambiente de 25 ± 2 °C. Durante 30 días, se evaluó a diario la germinación (emergencia de 1 mm de radícula, de acuerdo a Rebouças & Santos 2008 y Zamith *et al.* 2013).

4.4 Tallos de *Pereskiopsis* sp. como portainjertos

En octubre del 2019 se adquirieron 60 tallos de *Pereskiopsis* sp. de 30 cm para su propagación vegetativa mediante estacas. Los tallos presentaban una base leñosa, y se evidenciaba que habían regenerado después de una o dos podas, algunos presentaban hojas en el tercio más cercano al ápice y otros ninguna, presentaban espinas muy desarrolladas lo cual indicaba que habían estado expuestos a estrés hídrico.

La primera siembra de propagación se realizó en octubre del 2019, se evaluaron los tallos para descartar los que estuvieran necróticos o secos. La limpieza se realizó mediante dos lavados en agua corriente, para retirar restos de hojas secas y restos de suelo de donde provenían. Posteriormente se cortaron en secciones de 10 a 20 cm, procurando obtener tallos rectos, no leñosos y sin nudos de regeneración. Para la siembra se retiraron manualmente las hojas y espinas de los 7 cm inferiores del tallo, y se sembraron a una profundidad de 4 a 5 cm. Como sustrato se usó una combinación de tierra preparada comercial (Renemar) y arena de construcción tamizada y lavada en agua corriente (textura mediana) (Fig. 5B) en proporción 2-1, en macetas largas o bandejas con profundidad de 5 a 10 cm, con una separación de al menos 5 cm entre planta y planta. Se sembraron tanto los tallos jóvenes como los leñosos. Para el enraizamiento no se requirió de reguladores de crecimiento.

Se mantuvieron en cultivo hasta que los tallos alcanzaron un máximo de 50 cm de alto, luego de lo cual se procedió a hacer una nueva poda y siembra.

Para las siguientes siembras se emplearon sustrato Premix 8 (Fig. 5D), para reemplazar tierra preparada comercial, y ARCITEK Mini de diámetro 8.0 a 12.5 mm (Fig. 5E); esto para asegurar asepsia en el sustrato y que pueda ser replicable; sus características fisicoquímicas se muestran en la Tabla 1.

A partir de la segunda siembra de propagación, se usó una mezcla de arena mediana tamizada y lavada en agua corriente (para facilitar el drenaje) (Fig. 5B) y sustrato comercial Premix 8 (aporta nutrientes, retención de humedad, características fisicoquímicas conocidas y es libre de patógenos) (Fig. 5D) en proporción 2:3, en bandejas de 55 x 28 x 6 cm, a las cuales se les realizó 24 perforaciones en la base para asegurar un buen drenaje y evitar pudrición de raíces por ahogamiento. Los tallos se cortaron a 15 cm y se retiraron manualmente las hojas y espinas de los 5 cm inferiores del tallo, se sembró a 4 cm de profundidad. Por cada bandeja se sembraron tallos dispuestos en 4 filas por 8 columnas. En cada cámara de cultivo se ubicaron seis bandejas (Fig. 4B).

Las bandejas se mantuvieron en cultivo entre 3 a 4 meses hasta que los tallos tuvieran una altura máxima de 40 cm (Fig. 6A), luego de lo cual se podaba y se hacía una nueva siembra. En la cuarta siembra de propagación se probó usar una mezcla de sustrato Premix 8 y arena mediana en proporción 2:1, observándose resultados similares a la proporción 3:2, por lo cual se usó la proporción 2-1 para la etapa experimental.

Entre los días 3 y 4 de julio del 2021 se sembraron los portainjertos de *Pereskiopsis* sp.. Para ello, se usaron macetas individuales de 5 x 5 x 8.5 cm, en las cuales se puso de fondo 2 cm de arcilla ARCITEK Mini de diámetro 8.0 a 12.5 mm (Fig. 5E) para facilitar el drenaje, se completó el volumen de la maceta con la mezcla de sustrato Premix 8 y arena mediana en proporción 2:1 (Figs. 5B y D) y se regó el sustrato hasta su saturación. Se podaron tallos de 10 cm, se retiraron manualmente las hojas y espinas de los 5 cm inferiores del tallo. Se sembraron cinco tallos por maceta, a 4 cm de profundidad, y se cubrió la superficie con arena gruesa (Fig. 5C). Cada maceta con cinco tallos como portainjertos fue la unidad experimental (Fig. 6C).

Tabla **1**: Características fisicoquímicas de los sustratos para siembra de *Pereskiopsis* sp., de acuerdo a su ficha técnica.

Sustrato	Sustrato Premix 8	Arcitek (arcilla expandida)
Composición	Turba de musgo *Sphagnum canadiense* (75% aprox), vermiculita (7% aprox.), perlita (18% aprox.), dolomita, yeso, agentes humectantes y fertilizantes.	Agregado de arcilla
Apariencia	Sustancia orgánica natural marrón claro a oscuro.	Redondeada
Olor	Leve a olor de tierra	-
Solubilidad en el agua	No corresponde	-
pH	5.0 – 5.5 (en agua)	-
Conductividad eléctrica (dS/m)	0.3 – 0.75	-
Conductividad térmica (W/m °C)	-	0.11
Densidad	1 12,1 – 160.2 (g/L)	358 ±15% (kg/m^3)
Granulometría (mm)	0 - 7	4.0 – 8.0
Capacidad de agua (%)	50 - 70	-
Absorción de agua (% de masa seca)	-	26.2
Capacidad de aire (%)	8 - 20	-
Porcentaje de humedad (%)	45 - 55	-
Elementos en ppm	NO3-N: 5-40; NH4-N: 2-20; P: 5-25; K: 25-100 ; Ca: 50-190 ; Mg: 30-100; S: 40-180; B: 0.05-0.3; Cu: 0.005-0.15; Fe: 0.1 -1.0; Mn: 0.3-1.5; Mo: 0.05-0.15	-
Resistencia al aplastamiento ±10% (MPa)	-	4.8

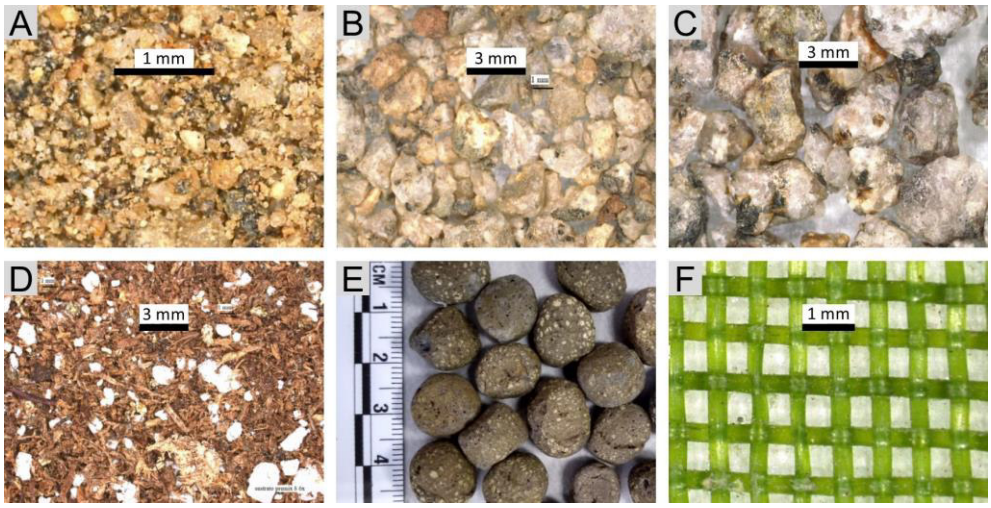


Figura 5. Sustratos. A. Arena fina Ø < 1 mm. B. Arena mediana Ø de 1-3 mm. C. Arena gruesa Ø > 3 mm. D. Sustrato Premix 8 Ø < 7 mm. E. Arcilla expandida ARCITEK Mini Ø 8 – 12.5 mm. F. Malla plástica con abertura aproximada de 0.5 mm.

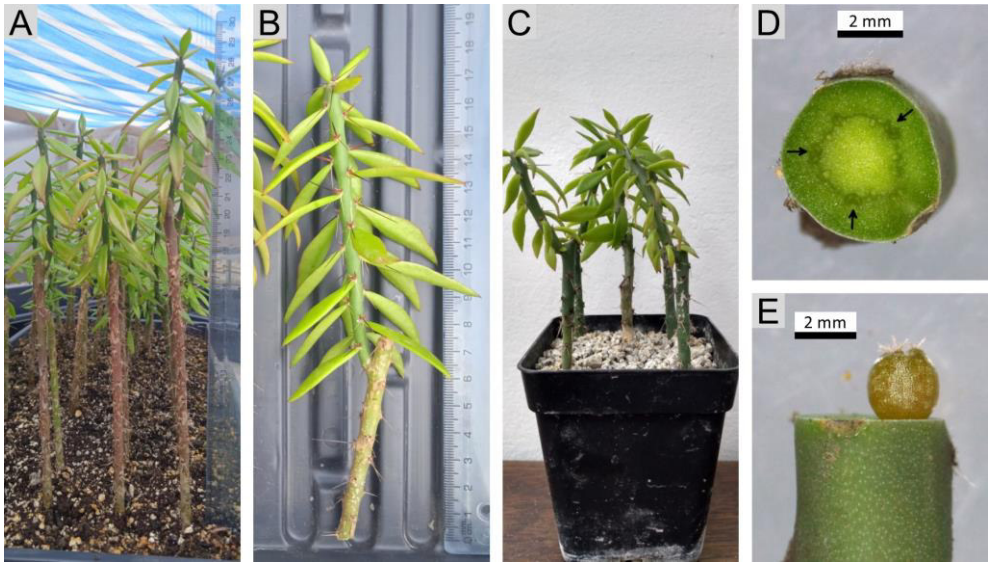


Figura 6. *Pereskiopsis* sp. como portainjerto. A. Tallos cultivados para propagación. B. Tallo seleccionado para portainjerto. C. Maceta con cinco portainjertos (unidad experimental). D. Corte transversal de tallo juvenil para microinjertar, las flechas señalan los haces vasculares. E. vista lateral de plántula de *M. bellavistensis* microinjertada sobre *Pereskiopsis* sp.

4.5 Cladodios de *Opuntia* sp. como portainjertos

Los tallos o cladodios de *Opuntia* sp. se obtuvieron el 4 de julio del 2021 de un solo individuo adulto ubicado en el cactario del Museo de Historia Natural – UNMSM; se colectaron cladodios jóvenes no leñosos que estaban sujetos a la planta madre (se descartaron los cladodios caídos y los que mostraran signos de herbivoría, heridas o plaga), estos se desprenden fácilmente haciéndolos girar sobre su base. Luego de su colecta se mantuvieron en bandejas no herméticas que permitieron su ventilación, hasta su siembra el día siguiente.

Para la siembra, primero se clasificaron los cladodios de acuerdo a su tamaño, seleccionándose para la siembra cladodios rectos, entre 11 a 15 cm de largo; luego, para prevenir la presencia de plagas, se remojó los cladodios durante 10 minutos en una solución acuosa de jabón de potasa (2 mL/L) y se dejó escurrir y secar al ambiente.

Se usaron macetas individuales de 5 x 5 x 8.5 cm en las cuales se colocó 2 cm de arcilla Arcitek Mini de diámetro 8.0 a 12.5 mm (Fig. 5E), se completó el volumen de la maceta con la mezcla de sustrato Premix 8 y arena mediana en proporción 2:1 (Figs. 5B y D), y se regó el sustrato hasta su saturación. Se sembró un cladodio a 3 cm de profundidad y se cubrió la superficie con arena gruesa (Fig. 5C). Cada maceta con un cladodio como portainjerto fue la unidad experimental (Fig. 7B).

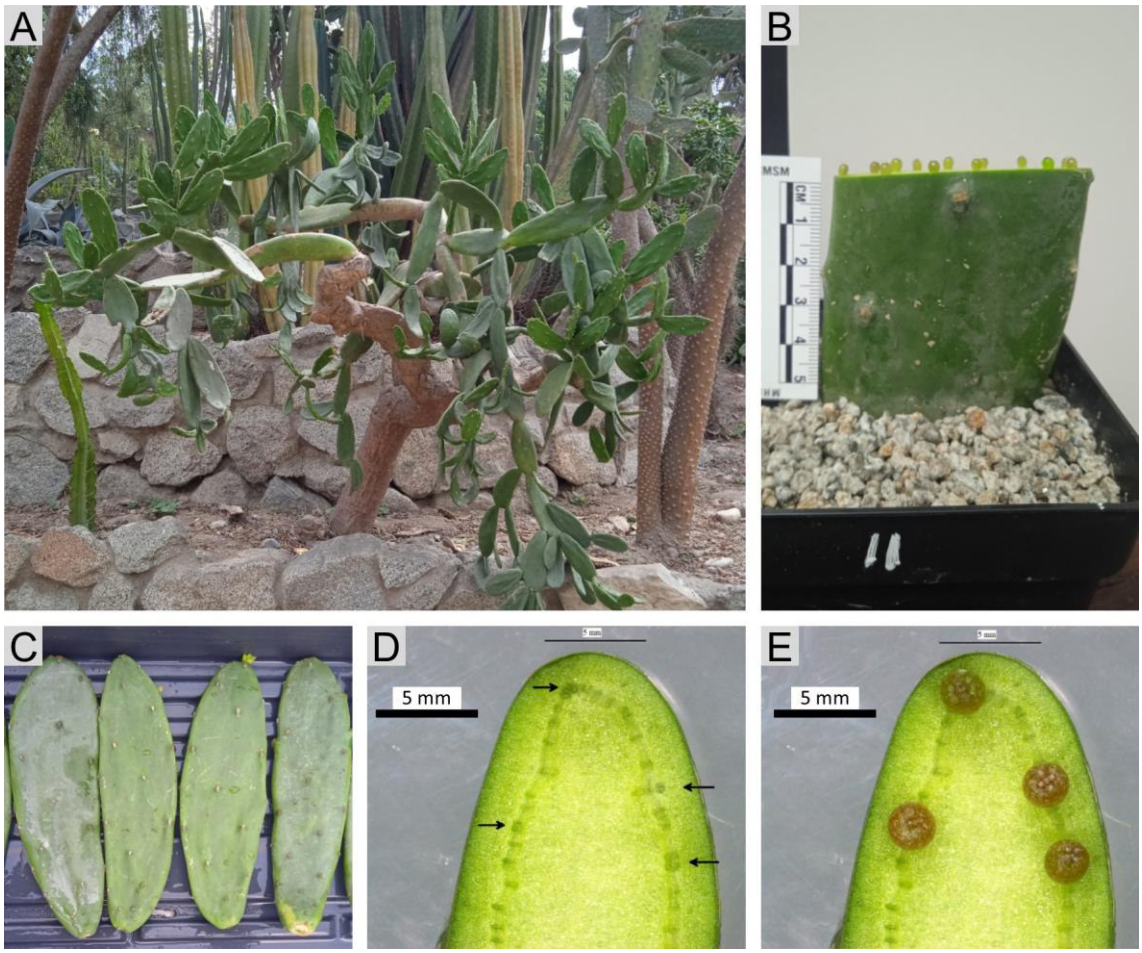


Figura 7. *Opuntia* sp. como portainjerto. A. Individuo adulto productor de cladodios jóvenes. B. Maceta con cladodio joven enraizado (unidad experimental). C. cladodios jóvenes recién colectados, libres de heridas o enfermedades. D. Corte transversal de cladodio, flechas señalan haces vasculares donde se colocan las plántulas a microinjertar. E. Plántulas de *M. bellavistensis* microinjertadas sobre *Opuntia* sp.

4.6 Plántulas de *Melocactus bellavistensis* como microinjertos

La colecta de semillas de *Melocactus bellavistensis* se realizó el 23 y 24 de noviembre del 2019 en el distrito de Bellavista, provincia de Jaén en el departamento de Cajamarca; de acuerdo con los reporte de la localidad TIPO (Backeberg 1976).

Para la colecta de semillas de *Melocactus bellavistensis*, y evaluación de la población, se requirió de un GPSMAP® 64s, winchas de 5 y 50 m, bolsas de papel, pinzas y etiquetas. Se colectaron los frutos maduros (reconocidos por que ya han emergido y se desprenden fácilmente del cefalio) y de color uniforme de los individuos que se encontraron en un área de 10 x 50 m del transecto ubicado entre las coordenadas 5°39'29.1"S 78°40'59.3"W y 5°39'27.8"S 78°41'00.0"W.

Los frutos se guardaron en sobres de papel con el nombre de la especie, colector y número de colección, coordenadas, fecha y lugar de colecta. Se mantuvieron a temperatura ambiente en un lugar ventilado hasta su limpieza en laboratorio dos días después. En el laboratorio, se revisó si había algún fruto que hubiera desarrollado hongos (para descartarlo), lo cual no ocurrió. La limpieza consistió en separar las semillas de la pulpa en una malla fina para luego lavarlas bajo agua corriente hasta eliminar el mucílago, posteriormente las semillas se esparcieron sobre papel filtro para su secado, todo este procedimiento se realizó a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C y 60% de humedad). Luego las semillas se guardaron a temperatura ambiente en sobres de papel con papel filtro, indicando la información de colecta. Las semillas se almacenaron así hasta su uso en la etapa experimental.

Sobre la base de los distintos trabajos de germinación reportados para distintas especies de *Melocactus*, se decidió evaluar distintos tratamientos para optimizar la obtención de plántulas de *Melocactus bellavistensis*.

4.7 Evaluación de germinación de *Melocactus bellavistensis*

En los ensayos preliminares y la literatura revisada se registró que las semillas no siempre germinan; y cuando lo hacen, desarrollan distintas características de coloración, diámetro y largo (Rebouças & Santos 2008; Zamith *et al.* 2013; Santos *et al.* 2020), que influyen en la aplicación de la técnica de microinjertado. Por esto, se requirió evaluar la germinación y características de las plántulas obtenidas, para seleccionar las más apropiadas para microinjertado.

Se evaluó fotoperiodo luz-oscuridad, temperatura, tipo de luz, y el tipo de plántulas obtenidas. Cada tratamiento consistió de 100 semillas maduras (Fig. 8A) por cada placa Petri (unidad experimental), con diez placas por tratamiento. Como sustrato se usó papel filtro, y se mantuvo la humedad con agua destilada. La germinación se evaluó a diario, por 30 días.

Los tratamientos (Tabla 2) se realizaron en cámara de cultivo MGC-350HP donde se evaluó a 25 ± 1 °C con fotoperiodo 12 - 12 y 0 - 24, a 30 ± 1 °C con fotoperiodo 12 - 12 y 0 - 24; en vivero, bajo luz natural directa, a 15 - 20 °C; y en laboratorio, bajo combinación de luz natural indirecta y luz blanca artificial (LED) a 21 - 24 °C.

Las plántulas obtenidas se mantuvieron en cultivo, y se aclimataron en la cámara de cultivo dos semanas antes del día de injertado. Previo al día de injertado se evaluó su tamaño (diámetro y altura), textura y si eran manejables para microinjertar.

Al seleccionar plántulas para microinjertar se excluyeron las transparentes, albinas (Fig. 13I) y las de color fucsia claro (Fig. 13F), ya que se observó que morían a las pocas semanas, también se excluyó las que mostraran hongos o daños mecánicos al separarlas del papel o mientras se manipulaban. Se prefirieron plántulas verde claro a oscuro, de más de 2 mm de largo, turgentes y de borde uniforme (Fig. 8F).

Tabla 2. Tratamientos para evaluar la germinación de *Melocactus bellavistensis*.

Temperatura (°C)	Fotoperiodo (luz – oscuridad)	Tipo de luz	Ubicación
25 ± 1	12 – 12	Artificial blanca LED	Cámara de cultivo
30 ± 1	12 – 12	Artificial blanca LED	Cámara de cultivo
21 - 24	12 – 12	Natural indirecta y artificial blanca LED	Laboratorio
15 – 20	12 – 12	Natural directa	Vivero
25 ± 1	0 – 24	Sin luz	Cámara de cultivo
30 ± 1	0 – 24	Sin luz	Cámara de cultivo

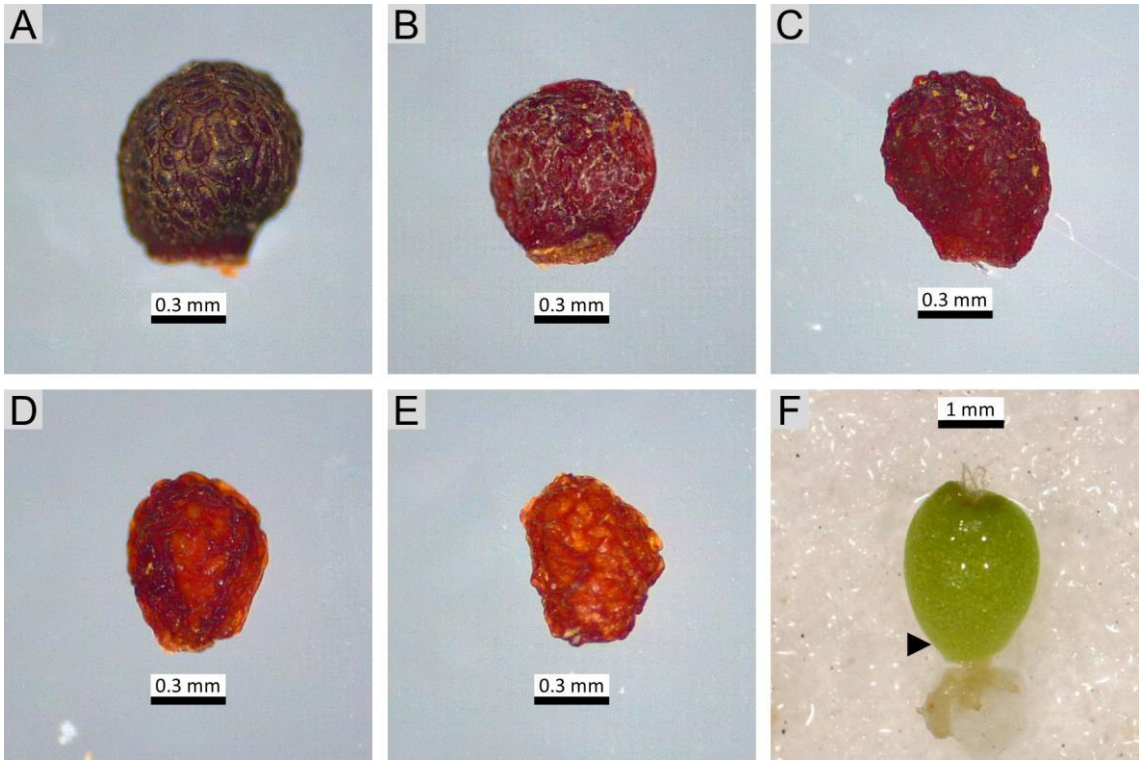


Figura 8. Semillas y plántula de *Melocactus bellavistensis*. A. semilla madura. B-E. Semillas inmaduras. F. Plántula para microinjertar (punta de flecha indica donde se realiza el corte transversal).

4.8 Técnica de microinjertado de plántulas de *Melocactus bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp.

Para microinjertar, primero se retiraron manualmente las hojas y espinas de los 2.5 cm superiores del portainjerto (Figs. 9B y D), se decapitó a 0.5 cm del ápice mediante un corte horizontal perpendicular al eje del tallo (Figs. 9C y E), luego se hizo un segundo corte horizontal y se dejó un disco de tallo cubriendo el corte para evitar deshidratación y cicatrización. Luego se seleccionó una plántula de *M. bellavistensis* y se hizo un corte horizontal sobre el inicio de la raíz (Fig. 8F) de manera que la superficie recién cortada estuviera en contacto con la hoja de afeitar para que no estuviera expuesta al aire y así evitar un secado o cicatrización; luego se retiró el disco de tallo dejado sobre el portainjerto, se deslizó la plántula sobre la superficie cortada y se ubicó la plántula sobre el haz vascular más grande que se observara en el portainjerto (Figs. 9G - I). Luego de microinjertar, se retornaron las macetas a la cámara de cultivo MGC-350HP (Fig. 4C) programada a 98 % de humedad y 25 ± 1 °C.

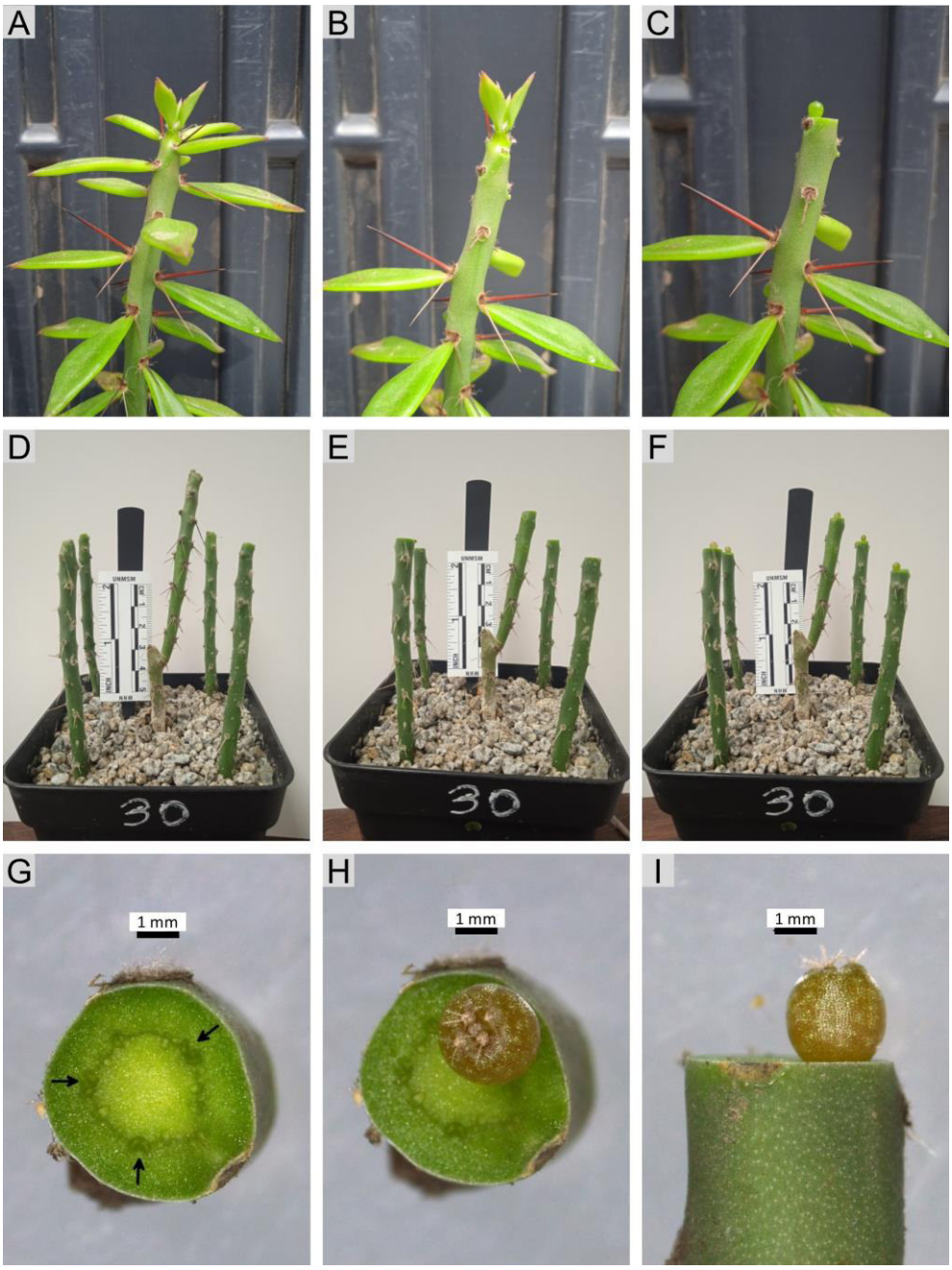


Figura 9. Técnica de microinjertado de plántulas de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. A. Portainjerto con hojas. B. Portainjertos sin hojas, espinas ni gloquidios. C. Portainjerto decapitado y microinjerto ubicado en el haz vascular. D – F. Microinjertado en una unidad experimental. G. Flechas indican haces vasculares, sitios para ubicar microinjertos. H - I. Vista superior y lateral de plántula microinjertada.

4.9 Técnica de microinjertado de plántulas de *Melocactus bellavistensis* sobre *Opuntia* sp.

De forma similar a *Pereskiopsis* sp., en el cladodio de *Opuntia* sp. se realizó un corte horizontal 3 cm bajo el ápice (Fig. 10A), luego se realizó otro corte horizontal, pero se dejó esta última sección de tejido sobre el portainjerto, para evitar que la herida cicatrice o se seque (Fig. 10B). Se seleccionó una plántula de *M. bellavistensis*, se hizo un corte horizontal sobre el inicio de la raíz (Fig. 8F) de manera que la superficie recién cortada estuviera en contacto con la hoja de afeitar; luego se deslizó el tejido que cubre el segundo corte horizontal y se ubicó la plántula sobre un haz vascular visible (Figs. 10D y E), se repitió este procedimiento hasta ubicar entre 8 a 12 plántulas por portainjerto (Figs. 10C y F). Luego de microinjertar, se retornaron las macetas a la cámara de cultivo MGC-350HP (Fig. 4C) programada a 98 % de humedad y 25 ± 1 °C.

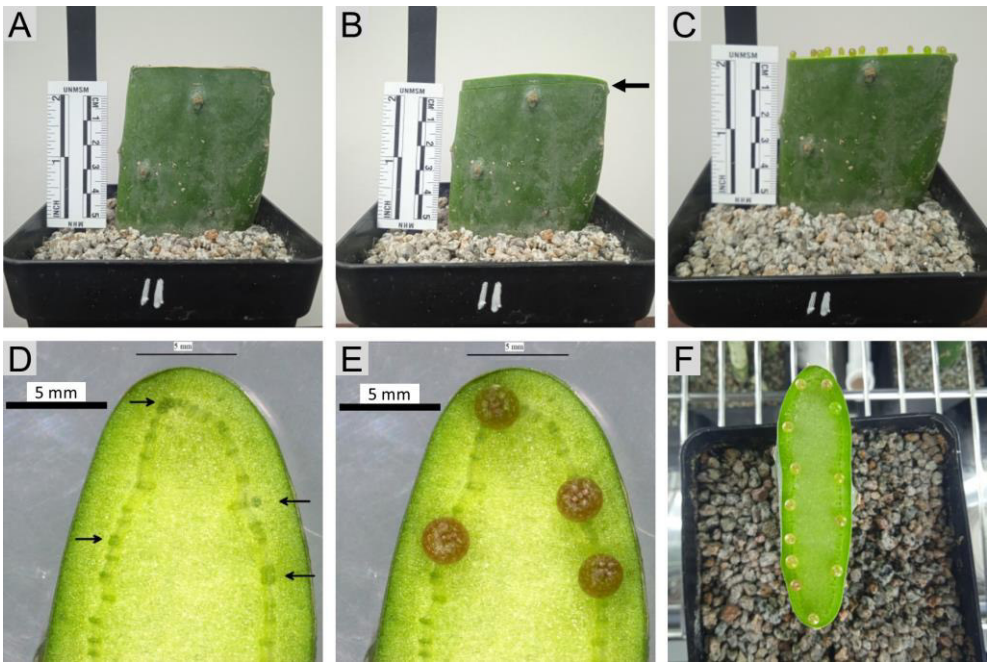


Figura 10. Técnica de microinjertado de plántulas de *M. bellavistensis* sobre cladodios de *Opuntia* sp. A. Primer corte transversal. B. Segundo corte transversal con sección de

tejido (flecha). C. Vista lateral de plántulas microinjertadas. D. Flechas indican haces vasculares, sitios para microinjertar. E - F. Vista superior de plántulas microinjertadas.

4.10 Variables, registro de resultados y análisis de datos

Cada maceta (unidad experimental) contenía cinco tallos jóvenes de *Pereskiopsis* sp. o un cladodio joven de *Opuntia* sp., y se emplearon 30 repeticiones para cada tipo de portainjerto.

El registro de sobrevivencia, diámetro y altura de microinjerto se realizó un mismo día para todas las macetas, en los días 30, 60, 90, 120, 150, 190 y 260 después del día de microinjertado.

Variables

- Independientes: temperatura, humedad y tiempo de evaluación.
- Dependientes: sobrevivencia del microinjerto, crecimiento del microinjerto (altura y diámetro mayor) y estadíos de desarrollo del microinjerto.

Se consideró muerto un microinjerto cuando el tejido se mostraba seco, con diámetro o altura menor a 1 mm o desprendido del portainjerto.

La medida de la altura se realizó desde la parte inferior de la cicatriz del microinjerto hasta el ápice superior, sin considerar las espinas.

La medida del diámetro mayor del microinjerto se realizó sin considerar espinas.

4.11 Seguimiento y mantenimiento del experimento

4.11.1 Actividades pre microinjertado

La siembra de portainjertos se dio el 3 y 4 de julio del 2021 se sembraron cinco tallos de *Pereskiopsis* sp. por cada maceta, y un cladodio de *Opuntia* sp. por cada maceta, cada una de estas se regó con 50 mL de agua filtrada y se mantuvieron a temperatura ambiente (14 a 19 °C) durante doce días. El agua filtrada se obtuvo de un Purificador con filtro de carbón activado y plata coloidal.

El 15 de julio, a cada maceta se aplicó por aspersión el insecticida TRIUNFADOR® 20 SP (Acetamiprid 200g-kg) en solución de 0.5 g por litro de agua destilada, e inmediatamente se ingresaron a la cámara de cultivo MGC-350HP, distribuyendo aleatoriamente 10 macetas de *Pereskiopsis* sp. y 10 de *Opuntia* sp. en cada uno de los tres niveles de la cámara de cultivo. Se programó la cámara de cultivo a 23 ± 1 °C, 80 % Hr, fotoperiodo 12 - 12, y luz al 60 %; a partir de este momento solo se modificó las variables de temperatura y humedad.

El 21 de julio se subió la temperatura a 25 ± 1 °C y 80 % Hr. A partir de esta fecha la temperatura se mantuvo programada a 25 ± 1 °C.

El 25 de julio se aplicó riego de 50 mL de agua filtrada a cada maceta, a partir de esta fecha se repitió este riego cada diez días y se revisaba si había brotes nuevos en *Opuntia* sp. para retirarlos.

El 21 y 23 de agosto se regó cada maceta con 50 mL de agua filtrada para asegurar que los portainjertos estuvieran hidratados el día de injertado. Y se programó la humedad a 98 % Hr.

Tabla 3. Resumen de actividades pre microinjertado.

Fecha	Día pre microinjertado	Actividad	Temperatura y humedad
03/07/2021	1	Siembra de 5 tallos de *Pereskiopsis* sp. o un cladodio de *Opuntia* sp., por maceta, para portainjertos. Riego con 50 mL de agua filtrada por maceta.	T: 14 – 19 °C Hr: -
15/07/2021	12	Aplicación de TRIUNFADOR® 20 SP, 0.5 g por litro de agua destilada. Ingreso a cámara de cultivo MGC-350HP, con fotoperiodo de 12 horas y luz al 60 %	T: 23 ± 1 °C Hr: 80 %
21/07/2021	18	Se subió la temperatura a 25 ± 1 °C	T: 25 ± 1 °C Hr: 80 %
25/07/2021	22	Se regó cada maceta con 50 mL de agua filtrada. El riego se repitió cada diez días. Se comenzó a podar los brotes en Opuntia sp.	
21/08/2021	49	Se regó cada maceta con 50 mL de agua filtrada. Se subió la humedad a 98 %.	T: 25 ± 1 °C Hr: 98 %

4.11.2 Actividades post microinjertado

El 24 y 26 de agosto se microinjertó las plántulas de *Melocactus bellavistensis* en los portainjertos de *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp.

El **27 de agosto** se consideró el **día 1 después de microinjertado**.

En los días 2, 10, 15 y 20 de septiembre se regó con 20 mL de agua filtrada, para mantener hidratados los portainjertos.

El 8 de septiembre (día 13), se fotografió los microinjertos de tres macetas de *Pereskiopsis* sp. y una de *Opuntia* sp.

El 14 de setiembre (día 19), se fotografió los microinjertos de dos macetas de *Opuntia* sp.

El 25 de septiembre (día 30), evaluación día 30 después de microinjertado, y se disminuyó la humedad relativa a 90 %. A partir de esta fecha se regó cada 10 días con 50 mL de agua filtrada por maceta, y se podaban los brotes nuevos de todos los portainjertos.

El 13 de octubre (día 48), se fotografió los microinjertos de todas las macetas.

El 25 de octubre (día 60), evaluación día 60 después de microinjertado, y se disminuyó la humedad relativa a 85 %.

Los días 40, 70, 100, 130, 160 y 200 se aplicó el insecticida TRIUNFADOR® 20 SP en solución de 0.5 g por litro de agua destilada. La aplicación de insecticida se realizó en el riego y se aplicó a los portainjertos mediante aspersión.

El 24 de noviembre (día 90), evaluación día 90 después de microinjertado, y se disminuyó la humedad relativa a 80 %.

El 24 de diciembre (día 120), evaluación día 120 después de microinjertado se aplicó un riego de 50 mL de agua filtrada por maceta, suplementado con fertilizante Fertiphos 20-20-20® 10 mL/L.

El 23 de enero (día 150), evaluación día 150 después de microinjertado, y se disminuyó la humedad relativa a 75. Esto como aclimatación previa a su traslado a cultivo en invernadero.

El 3 de febrero (día 161), se trasladaron todas las macetas a una cámara húmeda, en un invernadero en el Museo de Historia Natural. Para evitar deshidratación de los microinjertos y portainjertos se regó con 50 mL de agua filtrada por maceta, y se continuó con este riego cada diez días.

El 4 de marzo (día 190), evaluación día 190 después de microinjertado.

El 13 de mayo (día 260), evaluación día 260 después de microinjertado. Con esta última medición se concluyó el experimento.

Para la aplicación de riego, insecticida o fertilizante se empleó guantes y aspersores, material exclusivo para cada producto y siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Tabla 4. Resumen de actividades post microinjertado.

Fecha	Día post microinjertado	Actividad	Temperatura y humedad
24/08/2021	0	Microinjertado de plántulas de *M. bellavistensis*.	T: 25 ± 1 °C Hr: 98 %
27/08/2021	1	Día 1 después de microinjertado	T: 25 ± 1 °C Hr: 98 %
-	2, 10, 15 y 20	Riego con 20 mL de agua filtrada.	
08/09/2021	13	Se fotografió los microinjertos de tres macetas de *Pereskiopsis* sp. y una de *Opuntia* sp.	
17/09/2021	19	Se fotografió los microinjertos de dos macetas de *Opuntia* sp.	
25/09/2021	30	Evaluación de diámetro, altura y sobrevivencia. Se disminuyó la humedad a 90 %. A partir de esta fecha, cada 10 días se regó con 50 mL de agua filtrada por maceta.	T: 25 ± 1 °C Hr: 90 %
13/10/2021	48	Se fotografió los microinjertos de todas las macetas.	

Tabla 4. Resumen de actividades post microinjertado. (continuación)

25/10/2021	60	Evaluación de diámetro, altura y sobrevivencia. Se disminuyó la humedad a 85 %.	T: 25 ± 1 °C Hr: 85 %
-	40, 70, 100, 130, 160 y 200	Aplicación de TRIUNFADOR® 20 SP, 0.5 g por litro de agua destilada. Se aplicó en el riego, y mediante aspersión.	
24/11/2021	90	Evaluación de diámetro, altura y sobrevivencia. Se disminuyó la humedad a 80 %.	T: 25 ± 1 °C Hr: 80 %
24/12/2021	120	Evaluación de diámetro, altura y sobrevivencia. Se aplicó un riego de 50 mL de agua filtrada por maceta, suplementado con fertilizante Fertiphos 20-20-20® 10 mL/L.	
23/01/2022	150	Evaluación de diámetro, altura y sobrevivencia. Se disminuyó la humedad a 75 %.	T: 25 ± 1 °C Hr: 75 %
03/02/2022	161	Se trasladaron todas las macetas a una cámara húmeda, en un invernadero. Se regó con 50 mL de agua filtrada por maceta, y se continuó con este riego cada diez días.	T: 21 - 32 °C Hr: 50 - 65 %
04/03/2022	190	Evaluación de diámetro, altura y sobrevivencia.	
5/2022	260	Evaluación de diámetro, altura y sobrevivencia. Última evaluación.	

5 RESULTADOS

5.1 Ensayos preliminares

5.1.1 Selección de portainjertos

De los tres individuos juveniles injertados sobre *Echinopsis pachanoi*; uno no prosperó, uno desarrolló de forma atípica (Fig. 11A) y otro creció en diámetro y altura pero con cicatrices en las costillas y con espinas curvadas y quebradizas (Fig. 11B). Si bien en esta prueba los individuos se mantienen vivos y los portainjertos les aportan los nutrientes, se descartó continuar con este portainjerto por requerir de individuos de 4 cm, que se podrían conseguir solo de poblaciones silvestres. Además, el mantenimiento en cultivo de plantas madre para la obtención de tallos como portainjertos y el establecimiento del experimento requerirían de un mayor tiempo y espacio del disponible.

Para las pruebas en las que se empleó plántulas como microinjertos, la técnica se consideró exitosa cuando estas lograron crecer y desarrollarse; mientras que las no exitosas incluyeron: plántulas injertadas que se secan, se desprenden o se mantienen vivas y unidas al portainjerto, pero sin mostrar crecimiento.

Una plántula microinjertada sobre *Pereskiopsis* sp. se consideró un microinjerto exitoso. En la Figs. 11D y 25F-H, se observa el crecimiento y desarrollo progresivo a lo largo de 20 meses. En las Figs. 25C y E, se observan microinjertos no exitosos, los cuales se mantuvieron vivos pero sin crecimiento durante poco más de 3 meses de evaluación.

En *Opuntia* sp., de las 6 plántulas microinjertadas por portainjerto, se observó que las plántulas que fueron ubicadas sobre los haces vasculares más grandes y observables a simple vista, fueron los más exitosos y hasta lograron prosperar dos microinjertos por

portainjerto, a los 3 meses (Fig. 25J); sin embargo, a los 13 meses solo uno de ellos se mantuvo (Fig. 25K) y continuó su desarrollo, incrementando su volumen, hasta el último mes evaluado (mes 19) (Fig. 25 L).

En las plántulas de *Hylocereus* sp., hasta los tres meses se observó que los microinjertos se mantenían vivos pero sin crecimiento (Figs. 25M y N), sin embargo, a partir del mes 8 crecieron y desarrollaron de forma similar a individuos silvestres (Figs. 25Ñ y O).

Si bien en las tres pruebas se obtuvieron microinjertos exitosos, se decidió continuar el experimento con tallos de *Pereskiopsis* sp. por su diámetro reducido, lo cual permite propagar en altas densidades y microinjertar una plántula por portainjerto; además, su crecimiento es rápido y de fácil propagación. En el caso de *Opuntia* sp., fue seleccionada por su facilidad de manejo cultural (pocas espinas o gloquidios), rápida propagación, cladodios de tamaño reducido y posibilidad de poder probar entre 6 a 12 microinjertos por portainjerto.

En el caso de las plántulas de *Hylocereus* sp., no se emplearon en experimentos posteriores debido a que la diversidad de cultivares complicaban la obtención de muchos tallos homogéneos, a lo cual se añade que la sobrevivencia de plántulas en el tiempo no fue constante en las pruebas preliminares. En algunos cultivares, las plántulas pueden tener más de 80 % de germinación, pero desarrollan tallos ramificados o no todos desarrollan.

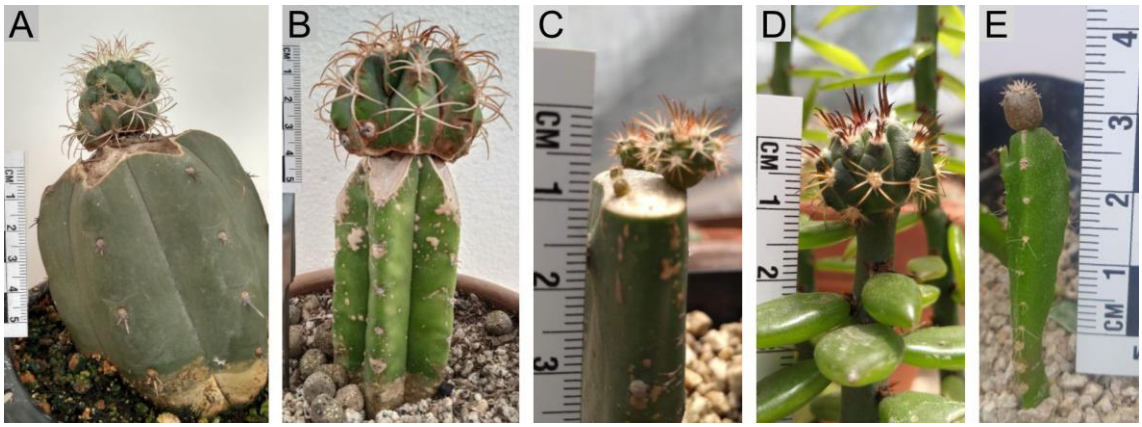


Figura 11. Pruebas de injerto de *Melocactus* sp. A y B. Juveniles silvestres de *M. bellavistensis* de 4 cm de diámetro colectados en Jaén – Cajamarca, foto tomada a los dos años después de injertados sobre *Echinopsis pachanoi*; C. Plántulas de *M. peruvianus* injertadas sobre *Opuntia* sp.; D. Plántula de *M. peruvianus* injertada sobre *Pereskiopsis* sp.; E. Plántula de *M. bellavistensis* microinjertada sobre *Hylocereus* sp.

5.1.2 Germinación

Se observó germinación (emergencia de radícula de 1 mm) a partir de la primera semana solo en presencia de luz, obteniéndose a los 30 días un 95 y 88 % de germinación en los tratamientos con agua destilada y peróxido de hidrógeno 5%, respectivamente (Tabla 5).

Si bien se observó un alto porcentaje de germinación en ambos tratamientos, en el tratamiento con peróxido de hidrógeno 5% se observó oxidación de las raíces luego de la segunda semana, lo cual dificultó el desarrollo de algunas plántulas y en algunos casos se deshidrataron o fueron atacadas por hongos.

Luego de esta prueba preliminar se decidió usar solo agua destilada para la germinación y un fotoperiodo de luz-oscuridad de 12 – 12.

Tabla 5: Germinación de *M. bellavistensis* en ensayos preliminares.

	Porcentaje de germinación	
Fotoperiodo luz-oscuridad (horas)	0 - 24	12 - 12
Agua destilada	0/120 (0%)	114/120 (95%)
Peróxido de hidrógeno 5%	0/120 (0%)	106/120 (88%)

5.2 Evaluación de germinación de *Melocactus bellavistensis*

La germinación de *M. bellavistensis* se dio solo en presencia de luz. En los tratamientos a 21 - 24 °C con combinación de luz natural indirecta y luz blanca artificial, a 25 ± 1 °C y a 30 ± 1 °C con luz blanca artificial la germinación inició entre los días 4 a 9 y alcanzó más del 85%; mientras que a 15 - 20 °C con luz natural directa inició el día 15 y llegó al 3.9% (Fig. 12, Tabla 6).

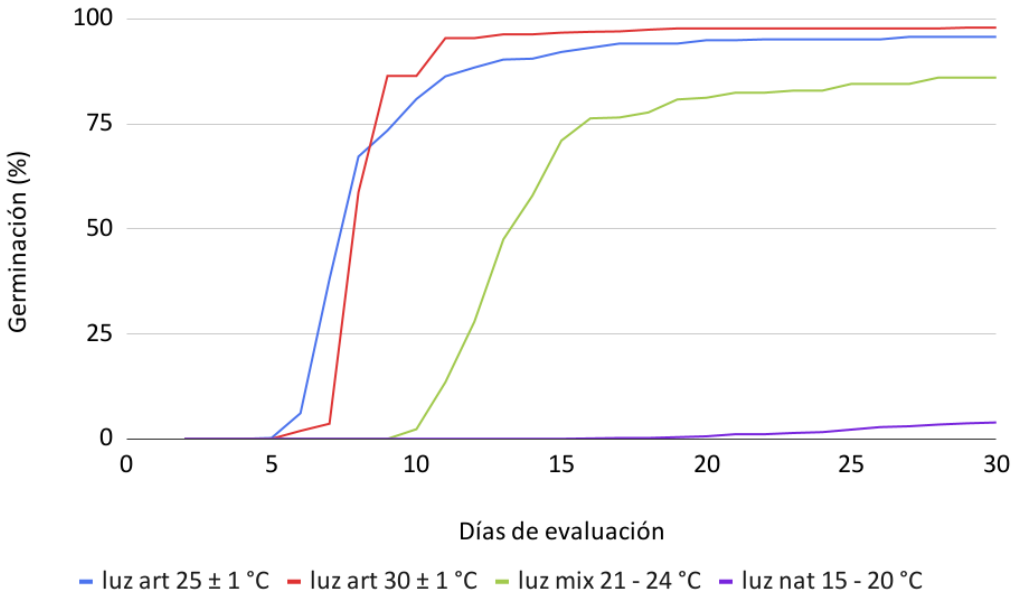


Figura 12. Germinación de *Melocactus bellavistensis* bajos distintas temperaturas y fuentes de luz. Luz art: luz artificial blanca LED; luz mix: combinación de luz natural indirecta y luz artificial blanca LED; y luz nat: luz natural.

Tabla 6: Germinación de *Melocactus bellavistensis* bajo distintos tratamientos de luz y temperatura.

Temperatura (°C)	Fotoperiodo (luz – oscuridad)	Tipo de luz	Germinación (%)
25 ± 1	12 – 12	Artificial blanca LED	96.0 ± 2.31
30 ± 1	12 – 12	Artificial blanca LED	97.9 ± 2.47
21 – 24	12 – 12	Natural indirecta y artificial blanca LED	86.7 ± 2.75
15 – 20	12 – 12	Natural directa	3.9 ± 1.60
25 ± 1	0 – 24	Sin luz	0
30 ± 1	0 – 24	Sin luz	0

El análisis estadístico de germinación, diámetro y altura se realizó con el programa InfoStat versión 2020 (Di Rienzo *et al.* 2020). Se comparó los tratamientos 25 ± 1, 30 ± 1 y 21 – 24 °C, con fotoperiodo 12-12.

Para la germinación, antes del análisis estadístico de los datos se aplicó la transformación $arcosen\sqrt{(\%\text{germinación}/100) - 4ac}\ x\ 180/3.1416$.

El supuesto de normalidad se evaluó mediante la prueba de Shapiro-Wilks modificado, se obtuvo un p-valor = 0.1565, por lo cual se admite la hipótesis nula de normalidad (p-valor>0.05). Para el supuesto de homogeneidad de varianzas se realizó un análisis de varianza, donde se obtuvo p-valor = 0.8119, por lo cual se admite la hipótesis nula de homogeneidad de varianzas. Al cumplirse estos supuestos se realizó la comparación de medias Tukey (P<0.05), obteniéndose que los porcentajes de germinación 96.0 ± 2.31 y 97.9 ± 2.47, obtenidos en los tratamientos a 25 ± 1 y 30 ± 1 °C, respectivamente, no presentan diferencias significativas entre sí; pero si difieren del porcentaje de germinación 86.7 ± 2.75 obtenido a 21 – 24 °C (Tabla 7).

Si bien el porcentaje de germinación es importante al propagar plántulas, se consideró también características como diámetro, altura y que sean manejables para el microinjertado.

Para la evaluación de diámetros y altura se promedió estas medidas de diez plántulas seleccionadas al azar de cada placa Petri, y se repitió para las diez repeticiones de cada tratamiento. Así, para cada tratamiento, se obtuvo diez promedios para diámetro y altura.

Para los diámetros, se evaluó el supuesto de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilks modificado, se obtuvo un p-valor = 0.5955, por lo cual se admite la hipótesis nula de normalidad (p-valor>0.05). Para el supuesto de homogeneidad de varianzas se realizó un análisis de varianza, donde se obtuvo p-valor = 0.9046, por lo cual se admite la hipótesis nula de homogeneidad de varianzas. Al cumplirse ambos supuestos, se hizo la comparación de medias Tukey (P<0.05), obteniéndose que los diámetros 2.39 ± 0.19, 2.37 ± 0.23 y 2.34 ± 0.26 mm de las plántulas obtenidas a 25 ± 1, 30 ± 1 y 21 – 24 °C, respectivamente, no presentan diferencias significativas entre sí (Tabla 7).

Para las alturas, se evaluó el supuesto de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilks modificado, se obtuvo un p-valor = 0.6853, por lo cual se admite la hipótesis nula de normalidad (p-valor>0.05). Para el supuesto de homogeneidad de varianzas se realizó un análisis de varianza, donde se obtuvo p-valor = 0.6431, por lo cual se admite la hipótesis nula de homogeneidad de varianzas. Al cumplirse ambos supuestos, se hizo la comparación de medias Tukey (P<0.05), obteniéndose que las alturas 2.20 ± 0.22 y 2.36 ± 0.29 mm de las plántulas obtenidas a 25 ± 1 y 30 ± 1 °C, respectivamente, no mostraron diferencia significativa entre sí; pero sí fueron estadísticamente diferentes de la altura 2.60 ± 0.40 mm obtenida en el tratamiento a 21 – 24 °C (Tabla 7).

Previo al experimento de microinjertado, se simuló la técnica de microinjertado con plántulas de los tres tratamientos. Las plántulas obtenidas a 25 ± 1 °C (Fig. 13A) tendían a ser de coloración marrón-rojiza; esféricas, por lo cual al realizar el corte transversal en su base quedaba poco tejido como microinjerto, y algunas no eran firmes al tacto lo cual dificultaba el corte. Las plántulas obtenidas a 25 ± 1 °C (Fig. 13D) presentaron una coloración rojiza, algunas no eran firmes al tacto o tendían a ser esféricas. Mientras que las plántulas obtenidas a 21 – 24 °C (Fig. 13G) eran de coloración verde claro; eran más largas que anchas, por lo cual el microinjerto era de mayor volumen, y eran más firmes al tacto lo cual facilitaba sujetarlas para el corte transversal. Por estas características, las plántulas obtenidas a 21 – 24 °C se emplearon para el experimento de microinjertado.

Ocasionalmente se observan plántulas transparentes, albinas, rojas a fucsia, con poca pigmentación, de tamaño muy reducido o de borde irregular (Figs. 13C, F e I), estas no se recomiendan para microinjertar; además, tienden a morir a las pocas semanas de germinadas.

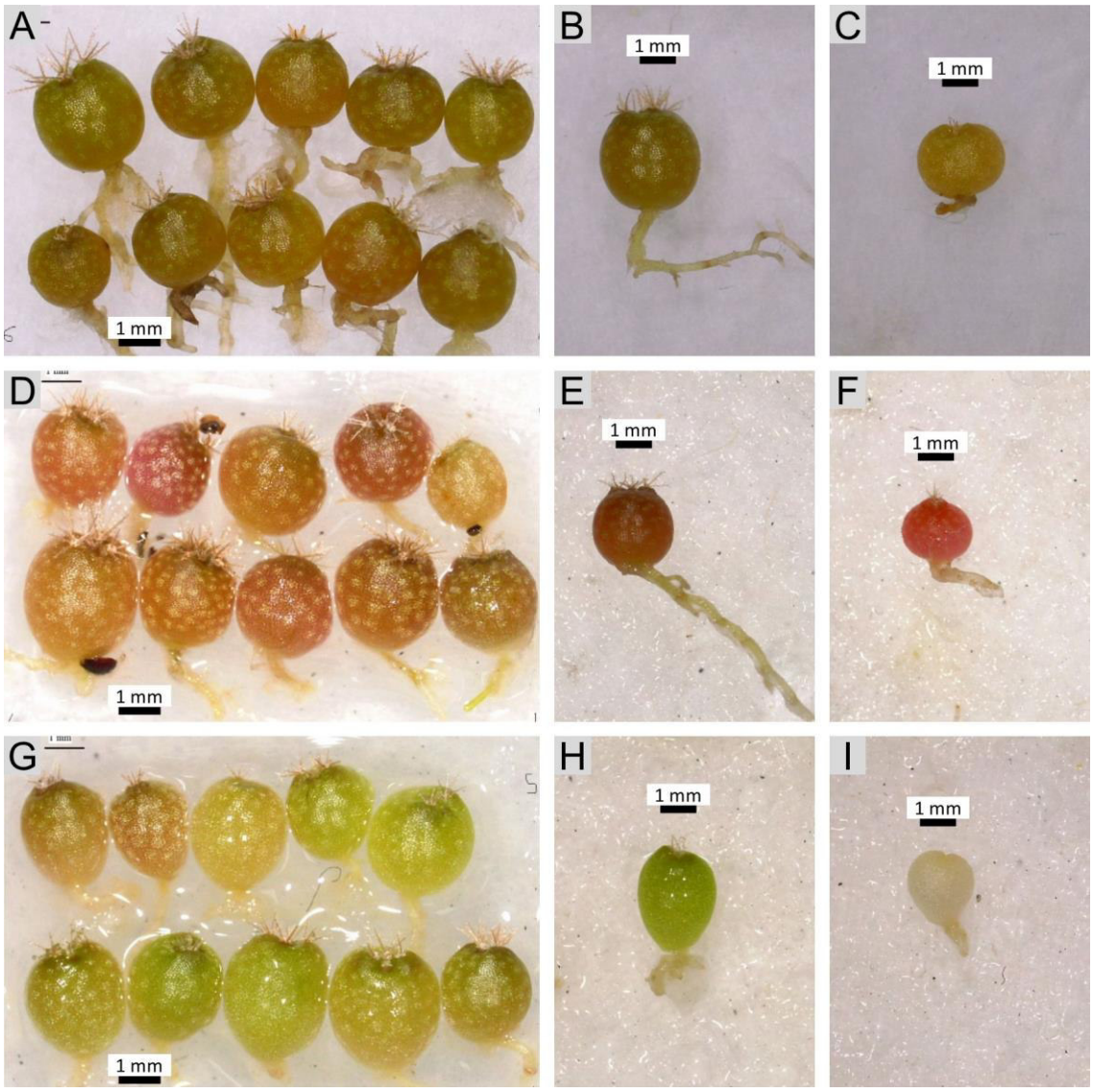


Figura 13. Plántulas de *Melocactus bellavistensis* germinadas: A - C. En cámara de cultivo a 25 ± 1 °C. D - F. En cámara de cultivo a 30 ± 1 °C. G - I. Con luz natural indirecta y luz artificial a 21 - 24 °C. H. Plántulas recomendadas para microinjertar. C, F e I. Plántulas no recomendadas para microinjertar.

Tabla 7: Comparación de germinación, diámetro y altura de germinación bajo distintas fuentes de luz, con fotoperiodo 12 - 12.

Temperatura (°C)	Tipo de luz	Días desde siembra	% germinación día 30*	Diámetro (mm)*	Altura (mm)*
25 ± 1	Artificial blanca LED	47	96.0 ± 2.31 [a]	2.39 ± 0.19 [a]	2.20 ± 0.22 [c]
30 ± 1	Artificial blanca LED	107	97.9 ± 2.47 [a]	2.37 ± 0.23 [a]	2.36 ± 0.29 [b]
21 - 24	Natural indirecta y artificial blanca LED	84	86.7 ± 2.75 [b]	2.34 ± 0.26 [a]	2.60 ± 0.40 [a]

* Medias con una letra en común no son significativamente diferentes (p>0.05).

5.3 Sobrevivencia de microinjertos de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp.

Luego de microinjertar las plántulas, cada maceta se ingresó a la cámara de cultivo MGC-350HP y no se movieron hasta la siguiente semana para el riego. Las evaluaciones de sobrevivencia, diámetro y altura de microinjerto se realizaron los días 30, 60, 90, 120, 150, 190 y 260 después del día de microinjertado.

La sobrevivencia de los microinjertos decreció en el primer mes, y se mantuvo con ligeras variaciones en las siguientes avaluaciones (Fig. 16).

Para los microinjertos sobre *Pereskiopsis* sp. la sobrevivencia fue mayor en los niveles superior y medio, mientras que sobre *Opuntia* sp. la sobrevivencia fue similar en los tres niveles (Tabla 8).

El día 13 después de microinjertado, se fotografiaron los microinjertos de cuatro macetas de *Pereskiopsis* sp. y una de *Opuntia* sp. y se registró: (1) microinjerto turgente que se

mantiene unido al portainjerto (Figs. 14L y 15D); (2) microinjertos medianamente turgentes que se mantienen unidos al portainjerto (Figs. 14C, H, I y K); (3) microinjertos que forman una nueva raíz y se desprenden del portainjerto (Figs. 14D y J); (4) microinjertos deshidratados (se consideran muertos) (Figs. 14E y F).

En *Pereskiopsis* sp., al comparar los microinjertos de una misma unidad experimental en los días 13 (Figs. 14G - L) y 48 (Figs. 14M - Q), de los microinjertos medianamente turgentes que se mantuvieron unidos al portainjerto: uno (Fig. 14H) se desprendió antes del día 48 (Fig. 14N), mientras que otros dos (Figs. 14I y K) se mostraron más turgentes al día 48 (Figs. 14Ñ y P).

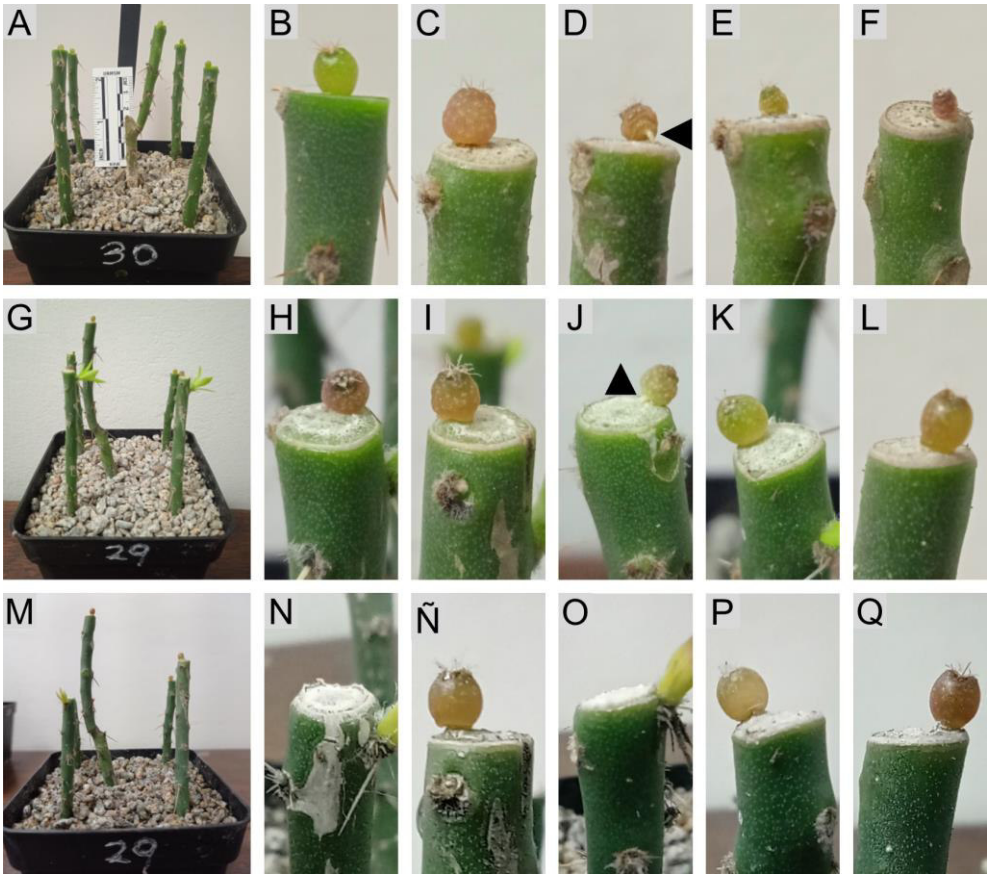


Figura 14. Sobrevivencia de microinjertos de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. A - B. Unidad experimental P30, el día del microinjertado. C - F. Ejemplos de microinjertos, a los 13 días de microinjertados, que no formaron una unión próspera de tejidos con el

portainjerto. D y J. Se formó una raíz en la base de la plántula (punta de flecha), lo que ocasiona el desprendimiento. G - L. Unidad experimental P29, día 13 después de microinjertado. M - Q. Unidad experimental P29, día 48 después de microinjertado.

De las 150 plántulas microinjertadas sobre *Pereskiopsis* sp., al día 30 después de microinjertado sobrevivían 48 microinjertos, siendo la principal causa de muerte la deshidratación, aun cuando la cámara de cultivo se mantuvo a 98% Hr. Al día 60 después de microinjertado, la sobrevivencia de microinjertos fue de 43, y se mantuvo constante hasta el día 150. En cultivo en invernadero se registró solo la muerte de un microinjerto en el día 190 (Fig. 16).

En *Opuntia* sp.; en una misma unidad experimental, al día 13 después de microinjertado se observó solo un microinjerto turgente y unido al portainjerto (Figs. 15C y D), siendo la deshidratación la causa de muerte de los demás microinjertos. Al día 19 (Figs. 15E y F) y 48 (Figs. 15G y H) el microinjerto se mantuvo vivo y turgente.

De las cerca de 360 plántulas microinjertadas sobre *Opuntia* sp., al día 30 sobrevivían 22 microinjertos, siendo también la deshidratación la principal causa de muerte. Al día 60 y 90 sobrevivieron 15 microinjertos, al día 120 y 150 sobrevivían 14 microinjertos. Luego del traslado a invernadero, los microinjertos disminuyeron a 10 en los días 190 y 260 (Fig. 16).

Al día 150 después de microinjertado, no se detectó un área específica en el portainjerto que favoreciera la sobrevivencia o desarrollo de los microinjertos (Fig. 17), generalmente se mantuvo vivo solo un microinjerto (Figs. 17A - D), ocasionalmente dos (Figs. 17E - G); y en un solo caso sobrevivieron tres microinjertos hasta el día 90 pero solo prosperó un microinjerto al día 120 (Fig. 17H).

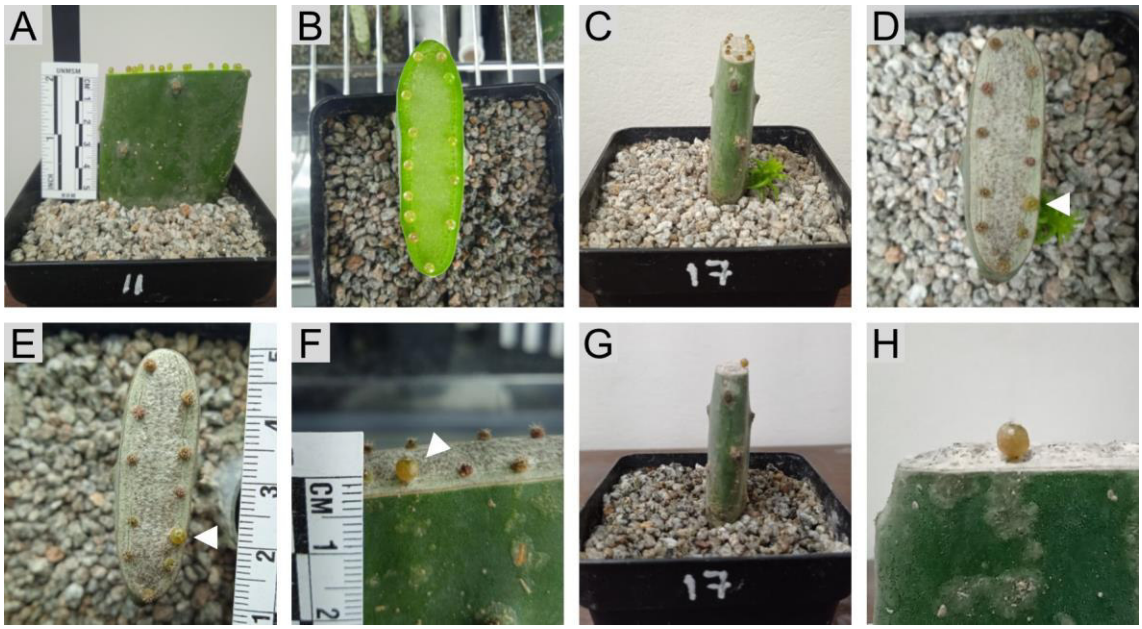


Figura 15. Sobrevivencia de microinjertos de *M. bellavistensis* sobre *Opuntia* sp. A - B. Día de microinjertado. C - H. Plántula con mayor turgencia (punta de flecha) a los días 13 (C y D), 19 (E y F) y 48 (G y H) de la unidad experimental O17.

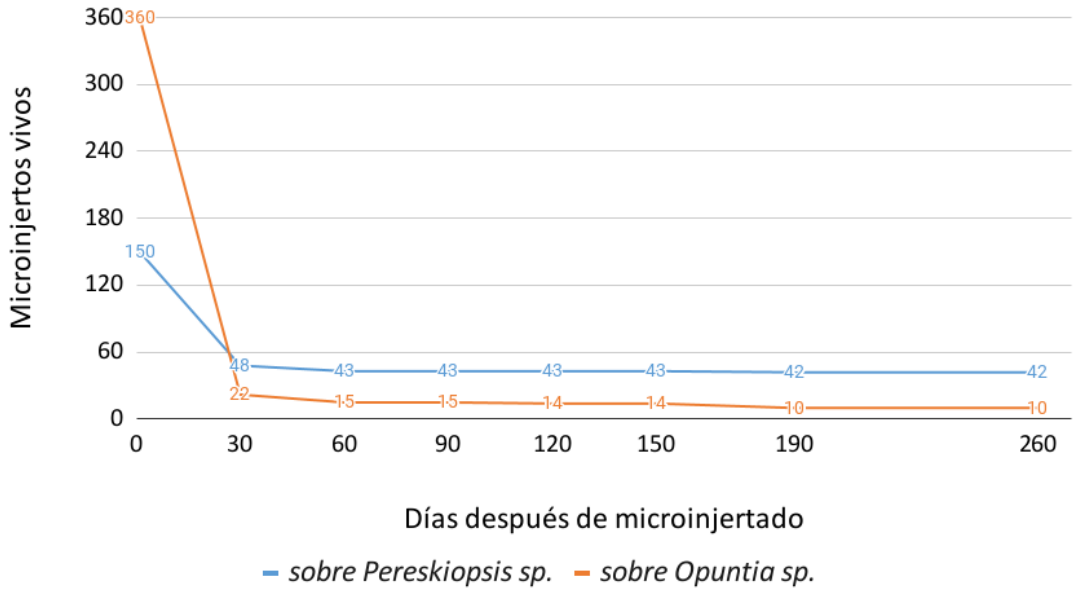


Figura 16. Sobrevivencia de microinjertos de *Melocactus bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp.

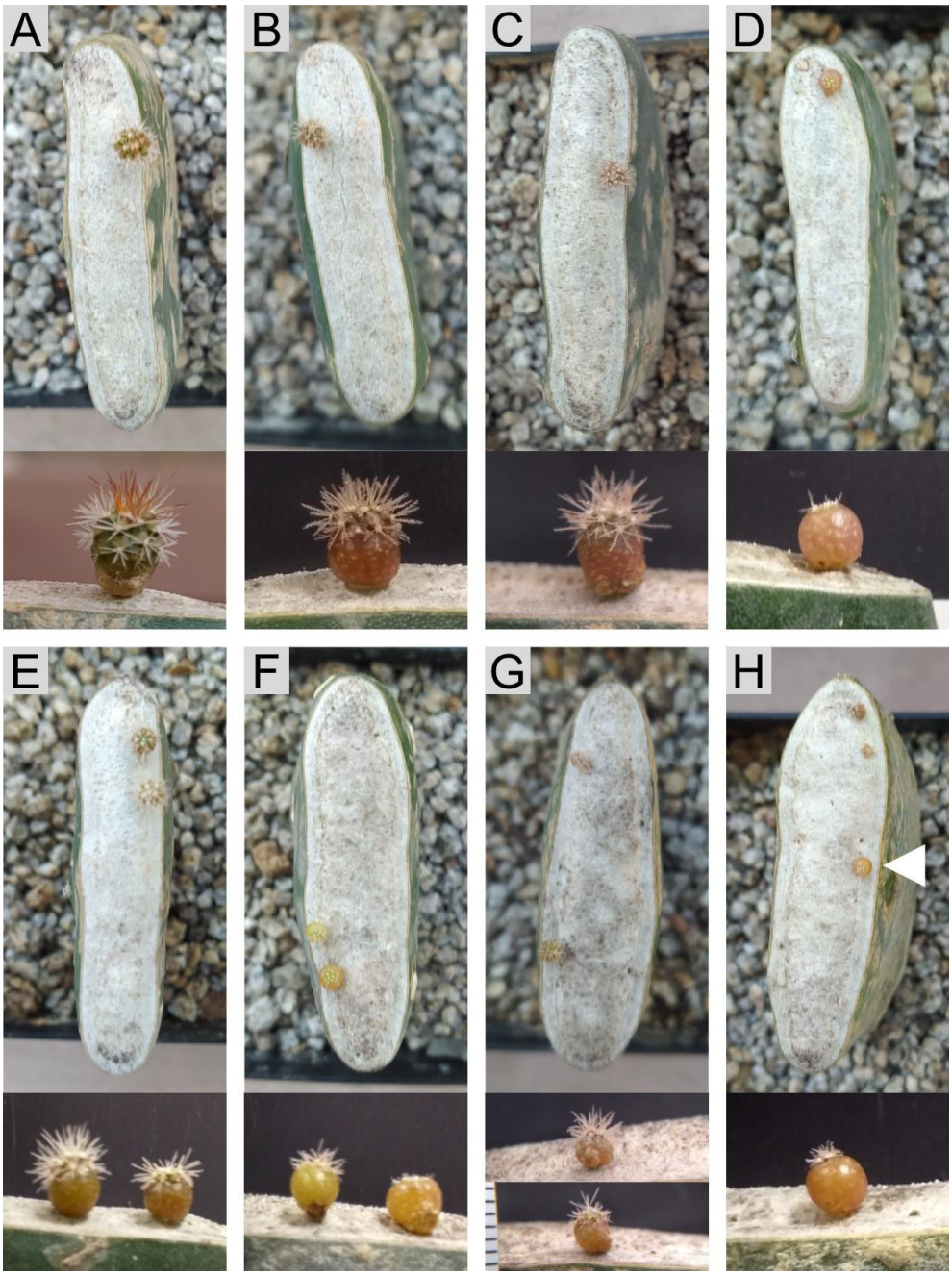


Figura 17. Ubicación de microinjertos de *M. bellavistensis* sobre *Opuntia* sp. a los 150 días después de microinjertado, y ampliación del microinjerto. Generalmente se mantuvo vivo solo un microinjerto (A - D), en ocasiones dos (E - G), y en un solo caso sobrevivieron tres microinjertos hasta el día 90 pero sobrevivió solo uno al día 120 (punta de flecha) (H).

Tabla 8: Sobrevivencia de microinjertos de *Melocactus bellavistensis* en cámara de cultivo MGC-350HP (niveles superior, medio e inferior).

	Número de individuos que sobrevivieron					
Tratamiento – Días después de injertado	1	30	60	90	120	150
Opuntia total	360	22	15	15	14	14
Pereskiopsis total	150	48	43	43	43	43
Opuntia nivel superior	120	7	2	2	2	2
Opuntia nivel medio	120	8	7	7	7	7
Opuntia nivel inferior	120	7	6	6	5	5
Pereskiopsis nivel superior	50	19	17	17	17	17
Pereskiopsis nivel medio	50	20	18	18	18	18
Pereskiopsis nivel inferior	50	9	8	8	8	8

5.4 Desarrollo de microinjerto de *Melocactus bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp.

Para el microinjertado, se seleccionaron plántulas verdes, turgentes, de superficie lisa y areolas con espinas incipientes. Durante el proceso de adaptación, y mientras se va estableciendo una conexión de tejido con el portainjerto, el microinjerto presenta variaciones en coloración, turgencia, forma y espinación.

Al día 48 (primera columna de las Figs. 18 a 24) ya se ha establecido una conexión de tejido entre el portainjerto y el microinjerto, por lo cual el microinjerto tiene una fuente de agua y se muestra turgente, aunque no ha desarrollado nuevas espinas, ni incrementado su tamaño y su coloración puede ser beige, marrón, rojiza o verde. Además, se pueden observar algunas marcas de insectos como trips (punta de flecha en Figs. 21F y 24F) o formación de callo en la base del microinjerto (Fig. 20T).

Al día 90 (segunda columna de las Figs. 18 a 24) y 120 (tercera columna de las Figs. 18 a 24), en algunos microinjertos se observó un ligero crecimiento, nuevas espinas incipientes blancas o grises, con estas se comienza a diferenciar nuevas areolas. La coloración de los microinjertos fue principalmente marrón claro a oscuro.

En el día 150 (cuarta columna de las Figs. 18 a 24) se registró intensificación de la coloración, ligero aumento de tamaño y número de espinas incipientes. Esta fue la última evaluación en cámara de cultivo MGC-350HP, luego se trasladó todas las macetas a invernadero.

En el día 260 (quinta columna de las Figs. 18 a 24) se registraron cambios a coloración verde, nuevos tipos de espinas y aumento en tamaño. Con estos cambios en algunos microinjertos, se pudo distinguir tres categorías.

Tipo 1. Microinjerto exitoso: coloración verde oscuro (presenta tejido fotosintético), altura ≥ 6 mm, espinas nuevas de color rojizo a marrón y se pueden distinguir costillas con tres o más areolas (Figs. 18E y J, 19E y J). En los ensayos preliminares, este tipo de microinjerto (Figs. 25B y J) prosperó en su desarrollo vegetativo (Fig. 25D, F-H, K y L).

Tipo 2. Probablemente exitoso: coloración marrón claro a oscuro, altura < 6 mm, espinas nuevas cortas, se distinguen algunas areolas nuevas pero no costillas (Figs. 20E, J, Ñ, S y X, 21E, 24E). En los ensayos preliminares, un microinjerto de este tipo se observó en *Pereskiopsis* sp. y no prosperó (Fig. 25C y E); mientras que de cuatro microinjertos sobre *Hylocereus* sp., tres prosperaron (Figs. 25M - O). Solo en este tipo se observó formación de callo en la base de un microinjerto (Figs. 20T - X).

Tipo 3. No exitoso: coloración marrón claro a oscuro, altura < 4 mm, espinas incipientes o ausentes (Figs. 22E, J y Ñ, 23E y J, 24E, J y Ñ). Solo se mantiene vivo y unido al portainjerto pero no se registra crecimiento.

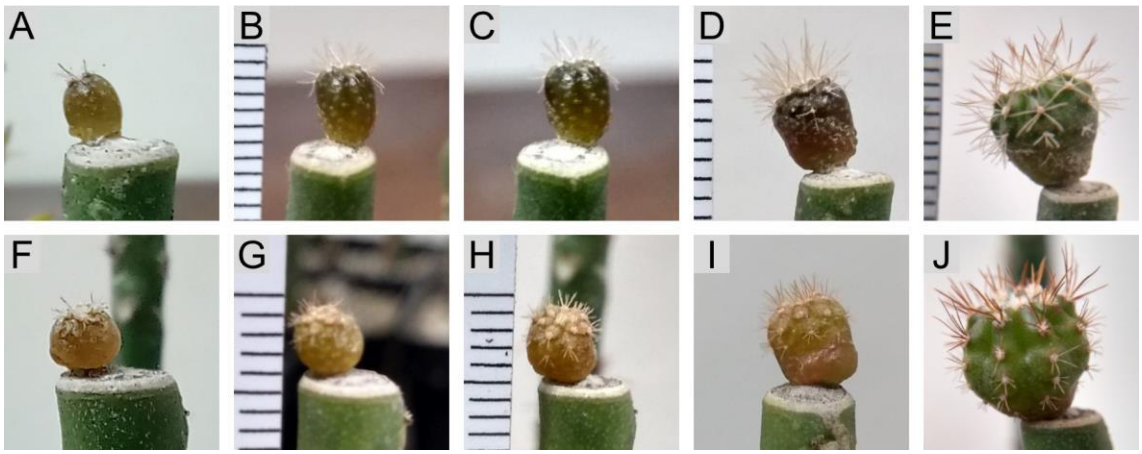


Figura 18. Desarrollo de microinjertos exitosos de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. a los 48 (A y F), 90 (B y G), 120 (C y H), 150 (D e I) y 260 (E y J) días después de microinjertado. Cada fila (A-E y F-J) corresponde a una misma unidad experimental.

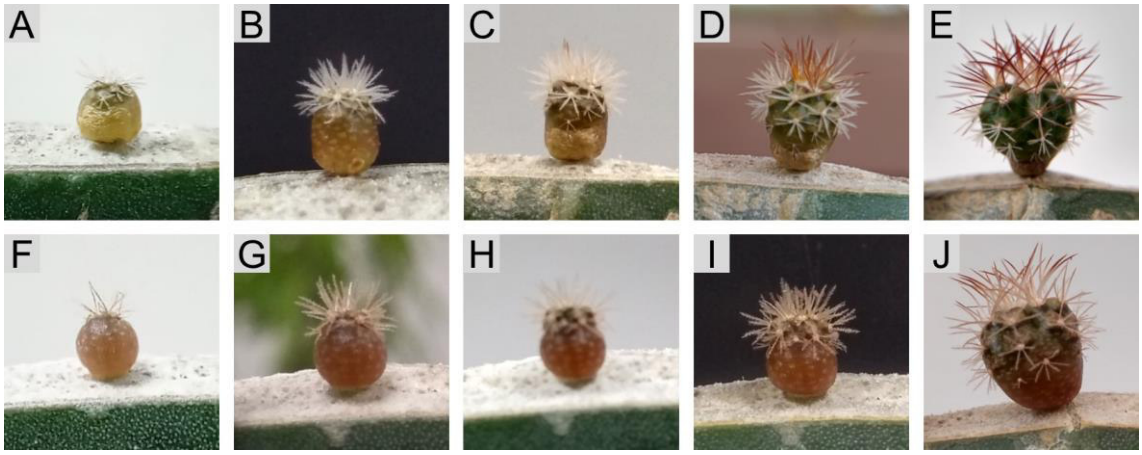


Figura 19. Desarrollo de microinjertos exitosos de *M. bellavistensis* sobre *Opuntia* sp. a los 48 (A y F), 90 (B y G), 120 (C y H), 150 (D e I) y 260 (E y J) días después de microinjertado. Cada fila (A-E y F-J) corresponde a la misma unidad experimental.

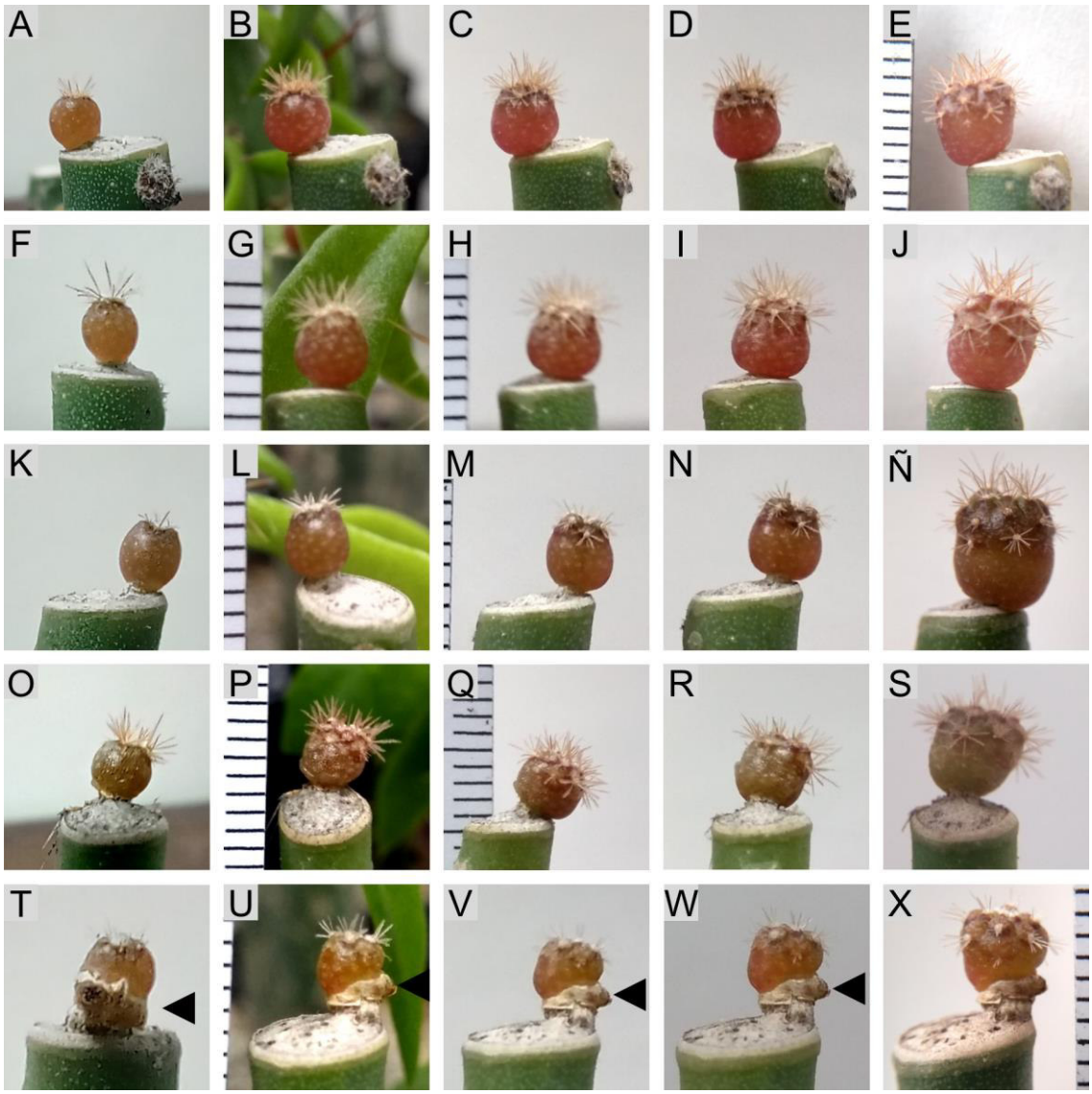


Figura 20. Desarrollo de microinjertos probablemente exitosos de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. a los 48 (primera columna), 90 (segunda columna), 120 (tercera columna), 150 (cuarta columna) y 260 (quinta columna) días después de microinjertado. Cada fila corresponde a la misma unidad experimental. Punta de flecha indica formación de callo en el microinjerto.

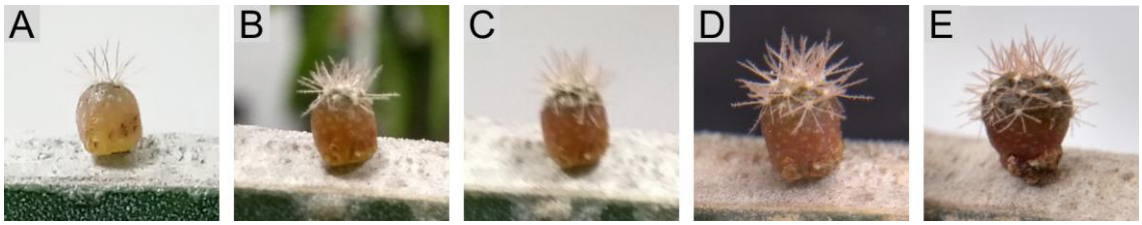


Figura 21. Desarrollo de microinjerto probablemente exitoso de *M. bellavistensis* sobre *Opuntia* sp. a los 48 (A), 90 (B), 120 (C), 150 (D) y 260 (E) días después de microinjertado. Secuencia corresponde a la misma unidad experimental.

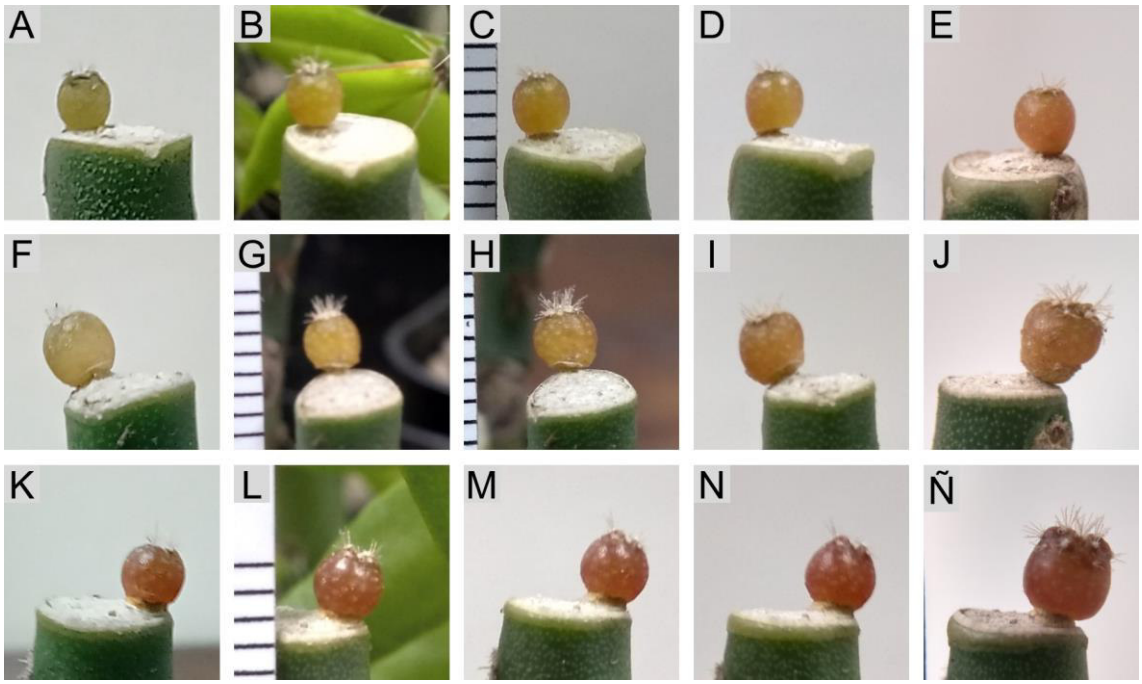


Figura 22. Desarrollo de microinjertos no exitosos de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. a los 48 (A, F y K), 90 (B, G y L), 120 (C, H y M), 150 (D, I y N) y 260 (E, J y Ñ) días después de microinjertado. Cada fila corresponde a la misma unidad experimental.

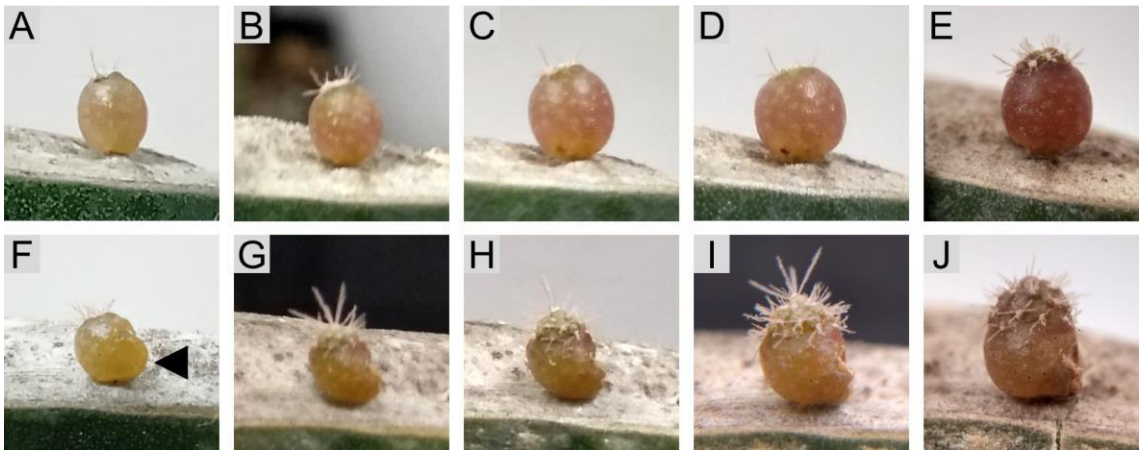


Figura 23. Desarrollo de microinjertos no exitosos de *M. bellavistensis* sobre *Opuntia* sp. a los 48 (A y F), 90 (B y G), 120 (C y H), 150 (D e I) y 260 (E y J) días después de microinjertado. Cada fila corresponde a la misma unidad experimental. Punta de flecha indica herida en el microinjerto.

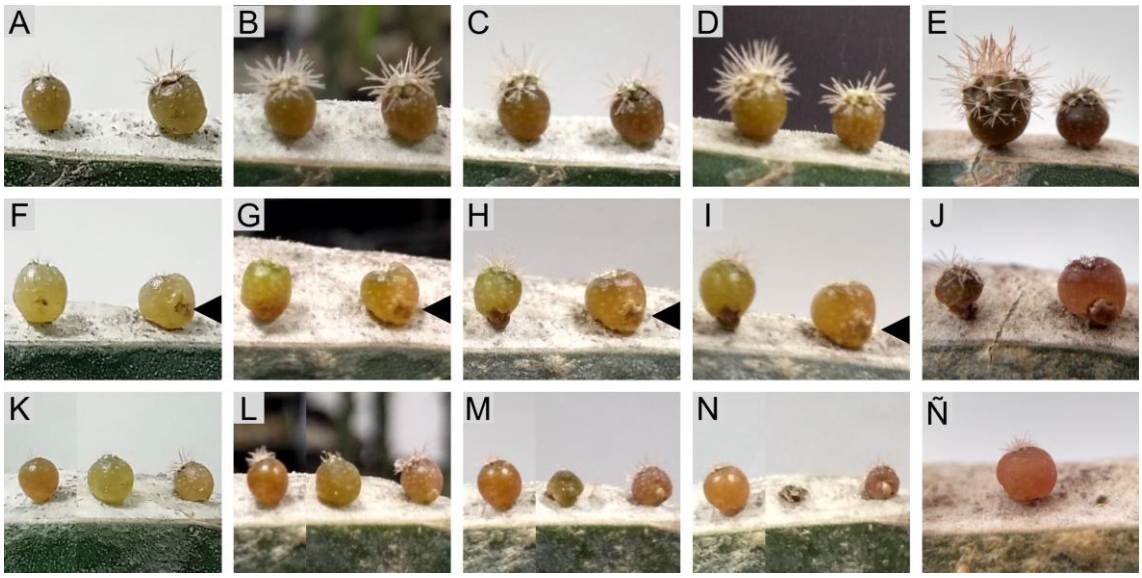


Figura 24. Desarrollo de más de un microinjerto de *M. bellavistensis* sobre *Opuntia* sp. a los 48 (A, F y K), 90 (B, G y L), 120 (C, H y M), 150 (D, I y N) y 260 (E, J y Ñ) días después de microinjertado. Cada fila corresponde a la misma unidad experimental. Punta de flecha indica herida en el microinjerto.

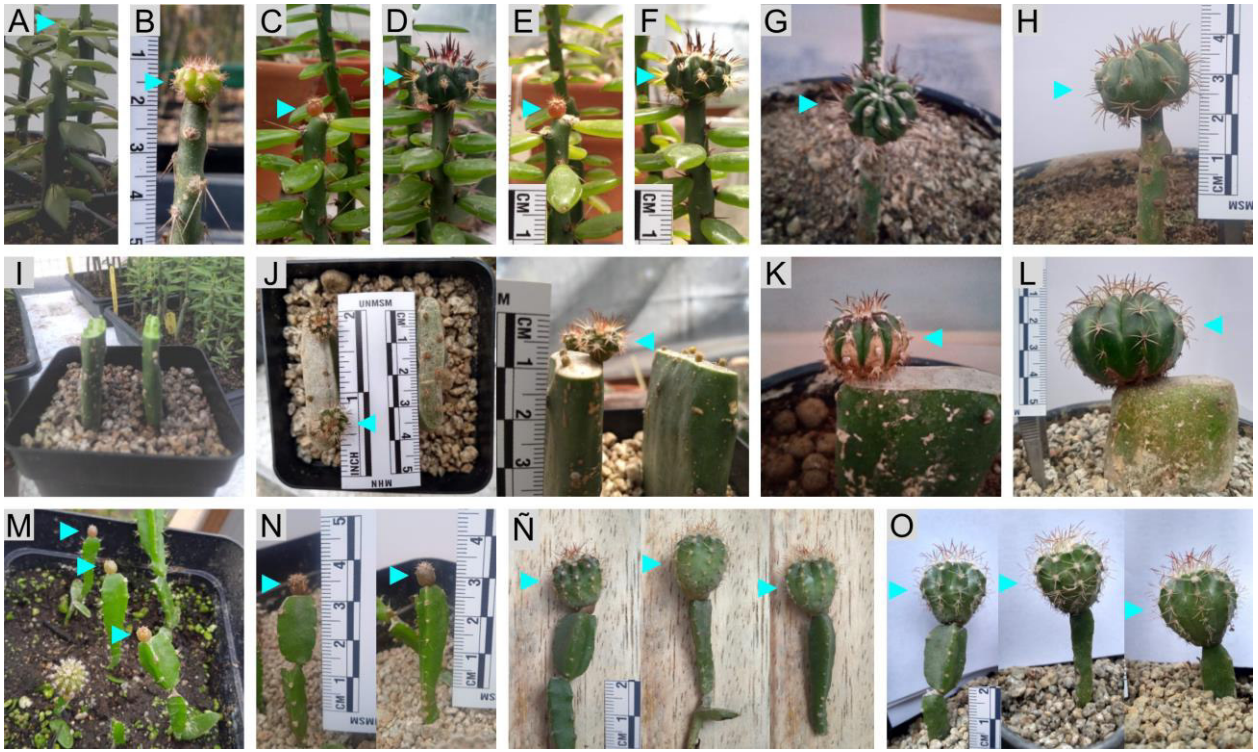


Figura 25. Ensayos preliminares para evaluar el desarrollo de microinjertos de *M. bellavistensis* sobre A-H. *Pereskiopsis* sp., I-L. *Opuntia* sp. y M-O. *Hylocereus* sp. A. Día de microinjertado. B. Microinjerto que prosperó. C y E. Microinjerto que se mantuvo vivo pero no creció, a los 78 y 98 días después de microinjertado (DDM), respectivamente. D, F, G y H. Microinjerto que prosperó a los 78, 98, 445 y 605 DDM, respectivamente. I. Día de microinjertado. J-L. Microinjerto que prosperó a los 67, 414 y 574 DDM, respectivamente. M-O. Microinjertos prósperos a los 53, 93, 264 y 295 DDM, respectivamente. Punta de flecha señala al microinjerto.

5.5 Crecimiento, en diámetro y altura, de microinjerto de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp.

Las plántulas de *M. bellavistensis* que se microinjertaron tenían 84 días de cultivo, 2.34 ± 0.26 mm de diámetro y 2.60 ± 0.4 mm de altura. Para los microinjertos se consideró tamaño inicial de 2 mm de diámetro y altura. El diámetro y altura de los microinjertos se registró cada 30 días después del microinjertado, sin considerar las espinas.

Se presenta la media de los microinjertos vivos en cada evaluación; no se ha realizado una comparación estadística debido a que los microinjertos no fueron homogéneos en su crecimiento ni desarrollo. Sin embargo, en promedio, mantuvieron un crecimiento sostenido a los largos de las evaluaciones (Figs. 26 y 27, Tablas 9 y 10).

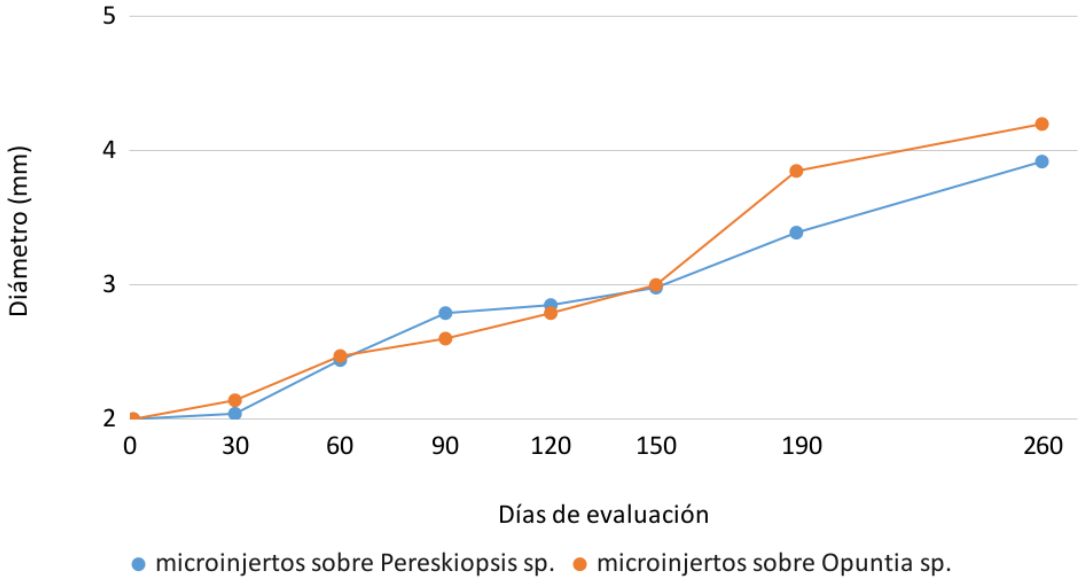


Figura 26. Diámetro de los microinjertos de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp. Se observó un crecimiento sostenido a lo largo de los 260 días después de microinjertado.

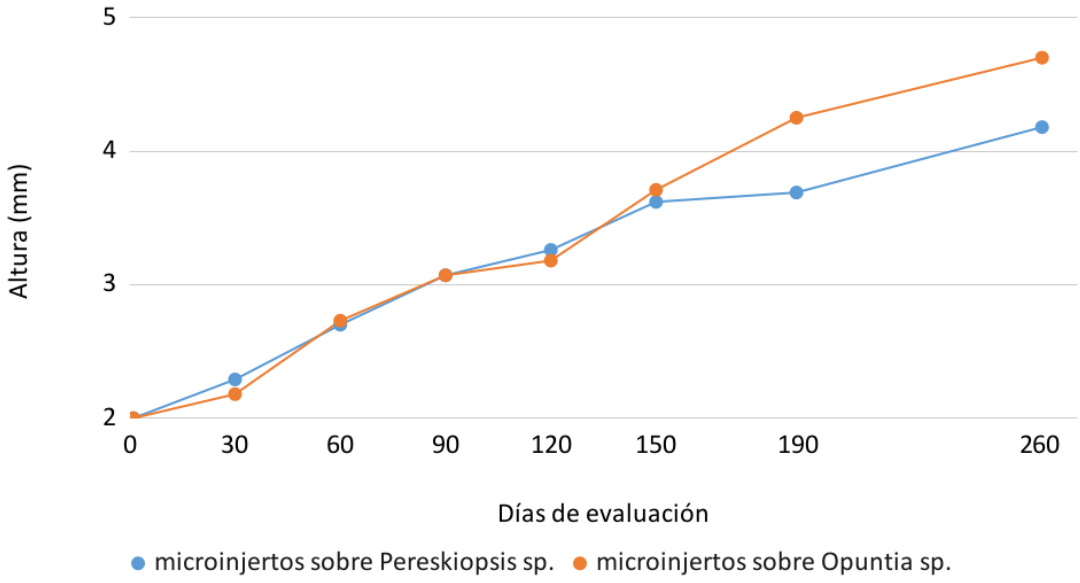


Figura 27. Altura de los microinjertos de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp. Se observó un crecimiento sostenido a lo largo de los 260 días después de microinjertado.

Tabla 9: Diámetro de microinjertos en cada evaluación.

	Diámetro (mm)						
Día de evaluación	30	60	90	120	150	190	260
Pereskiopsis sp.	2.04 ± 0.20	2.44 ± 0.50	2.79 ± 0.60	2.85 ± 0.52	2.98 ± 0.59	3.39 ± 0.83	3.92 ± 1.45
Opuntia sp.	2.14 ± 0.35	2.47 ± 0.52	2.60 ± 0.51	2.79 ± 0.43	3.00 ± 0.71	3.85 ± 0.97	4.2 ± 1.57

Tabla 10: Altura de microinjertos en cada evaluación.

	Altura (mm)						
Día de evaluación	30	60	90	120	150	190	260
Pereskiopsis sp.	2.29 ± 0.46	2.70 ± 0.56	3.07 ± 0.55	3.26 ± 0.50	3.62 ± 0.65	3.69 ± 0.80	4.18 ± 1.13
Opuntia sp.	2.18 ± 0.39	2.73 ± 0.59	3.07 ± 0.46	3.18 ± 0.77	3.71 ± 0.89	4.25 ± 0.95	4.7 ± 1.70

6 DISCUSIÓN

6.1 Germinación de *Melocactus bellavistensis*

Debido a que se emplearon plántulas como microinjertos, es necesario evaluar las características de estas y los medios de germinación. Ya que van a ser determinantes para el desarrollo y éxito de la técnica.

Considerando los reportes de germinación a temperaturas sobre los 20 °C, en este estudio se comprobó que las semillas de *M. bellavistensis* son fotoblásticas positivas, lo cual concuerda con observaciones para otras especies del mismo género, como *M. conoideus* con 80% de germinación a 30 °C (Rebouças & Santos 2008), *M. sergipensis*, *M. violaceus* y *M. zehntneri* con 58 a 64% de germinación a 25 ± 2 – 29 ± 4 °C (Santos *et al.* 2020), y *M. bahiensis* con 10 a 45% de germinación a temperaturas constantes de 20, 25 o 30 °C (Lone *et al.* 2007).

Cuando se mantuvo un fotoperiodo de 12 - 12 horas luz - oscuridad y se comparó la germinación a distintas temperaturas, la germinación de *M. bellavistensis* a menos de 20 °C fue de 3.9 ± 1.60%. Sin embargo, fue mayor a 80% cuando la temperatura evaluada estuvo entre los 21 – 30 °C, lo cual concuerda con lo obtenido para *M. conoideus* (Rebouças & Santos 2008), pero difiere de lo observado en otras especies, donde los porcentajes de germinación son menores; como el caso de *M. violaceus* donde se obtuvo 60% de germinación cuando la temperatura fluctuó entre 20 a 37 °C, pero menor a 10% de germinación con temperaturas constantes de 25 o 35 °C *(Zamith et al.* 2013); y para *M. bahiensis* la germinación a temperaturas constantes de 25 °C fue entre 45 - 48%, y a 20 o 30 °C fue menor al 20% (Lone *et al.* 2007).

Cuando se evaluó el tipo de luz empleada, manteniéndose la temperatura entre 21 a 30 °C, en este trabajo se obtuvo una diferencia estadística significativa entre la germinación con luz artificial blanca (96.0 y 97.9%) y la germinación con una combinación de luz

natural indirecta y luz artificial blanca (86.7%). Rebouças & Santos (2008) reportan, para *M. conoideus*, que el tipo de luz influyó en el porcentaje de germinación con valores estadísticamente diferentes para luz roja extrema, luz roja y luz blanca, con cerca del 90, 70 y 40% de germinación, respectivamente. De forma similar, para la germinación *in vitro* de *M. sergipensis*, *M. violaceus* y *M. zehntneri* con luz artificial blanca o luz natural parcial, se obtuvo el doble de germinación con este último tratamiento en cada especie evaluada (Santos *et al.* 2020). Estos reportes sustentan que el tipo de luz empleada tiene un efecto importante en la germinación de las especies del género *Melocactus*, siendo el caso más resaltante el reportado por Santos *et al.* (2020), en el cual las plántulas obtenidas bajo luz natural en invernadero tuvieron un mayor porcentaje de germinación, acumulación de biomasa y sobrevivencia, que las obtenidas en cultivo bajo luz artificial, siendo esto atribuido a que la luz natural contiene mayores longitudes de onda.

La altura de las plántulas de *M. bellavistensis* obtenidas al germinar sobre papel filtro fue de 2.21 a 2.61 mm. Mientras que para *M. bahiensis* fue similar cuando se germinaron sobre papel filtro, 2.87 a 3.87 mm, la altura fue mayor cuando la germinación fue sobre arena, 5.08 a 5.81 mm (Lone *et al.* 2007).

El diámetro obtenido en plántulas de *M. bellavistensis* fue entre 2.34 a 2.39 mm, sin diferencias estadísticas entre los tratamientos. Cuando se evaluó la germinación *in vitro*, empleando luz natural o artificial, las plántulas obtenidas de *M. violaceus* y *M. zehntneri* presentaron diámetros entre 2.0 a 2.06 mm y las de *M. sergipensis* entre 2.0 a 2.67 mm Santos *et al.* (2020).

En el género *Melocactus*, es necesaria la luz para la germinación, y esta se ve influenciada por el fotoperiodo, la temperatura y el tipo de luz.

6.2 Microinjertos de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp.

Se decidió emplear plántulas como material vegetal debido a que *M. bellavistensis* no genera hijuelos ni regenera nuevos individuos al seccionarse, también se descartó usar plantas juveniles para no afectar las poblaciones silvestres; limitándonos únicamente a la colecta de frutos maduros en una ocasión, aprovechando que se puede almacenar un gran número de semillas en poco espacio, se alcanza más del 80% de germinación y principalmente porque las plántulas propagadas mantendrán variabilidad genética, como lo recomiendan Santos-Díaz *et al.* (2022).

El éxito de la técnica y la sobrevivencia de las plántulas van a depender principalmente de la humedad ambiental, tamaño del microinjerto y la propia capacidad de ambas plantas para regenerarse y aclimatarse.

6.2.1 Condiciones de cultivo

Las condiciones de cultivo durante las primeras horas y días son determinantes para la sobrevivencia del microinjerto, principalmente para evitar la desecación o desprendimiento. Las semanas posteriores determinan la adaptación del microinjerto con el portainjerto; y luego su crecimiento y desarrollo.

La técnica de microinjertado se desarrolló y se suele realizar en cultivo *in vitro*, por lo cual el desprendimiento del microinjerto por un movimiento brusco es poco frecuente, se mantiene una alta humedad evitando así la desecación, el fotoperiodo suele ser de 12 a 16 horas luz y la temperatura cercana a los 25°C le permiten mantener un metabolismo activo (Navarro *et al.* 1975; Estrada-Luna *et al.* 2002; Badalamenti *et al.* 2016).

Para el género *Melocactus*, se reporta el cultivo *in vitro* de *M. glaucescens* a 25 ± 3 °C, fotoperiodo de 16 h y 60 µmol m^{-2} s^{-1} (Torres-Silva *et al.* 2018), mientras que para *M.*

matanzanus y *M. curvispinus* se ha realizado bajo luz continua de 54 µmol m^{-2} s^{-1} y temperatura de 20 y 25 ± 2°C, respectivamente (Retes-Pruneda *et al.* 2007; Wyka 2007).

Durante este experimento, los microinjertos se mantuvieron en la cámara de cultivo a 25 ± 1 °C, similar a lo reportado para cultivo *in vitro* de otras especies de *Melocactus*, con 12 horas de fotoperiodo y a 360 µmol m^{-2} s^{-1}. Respecto a la humedad, se mantuvo a 98 % las cuatro primeras semanas, y se disminuyó gradualmente cada mes.

Bajo estas condiciones de cultivo, los portainjertos desarrollaron nuevos brotes que tuvieron que ser frecuentemente podados, lo que indicó que las condiciones eran óptimas para su desarrollo. Los microinjertos presentaron una alta mortandad el primer mes, la mayoría asociado a deshidratación producto del estrés que genera la técnica, siendo mínima la mortandad en las siguientes evaluaciones hasta el día 160 en que se trasladaron a invernadero. Si bien se simularon condiciones similares a las reportadas para cultivo *in vitro* (Santos *et al.* 2020), como la humedad al 98% en el interior de la cámara de cultivo, esta no fue suficiente. Esto se explicaría porque la humedad elevada en cultivo *in vitro* se da para cada frasco o unidad experimental; a diferencia de este experimento donde la humedad se programó en toda la cámara de cultivo y esta tiene ciclos de recirculación de aire que hacen que la humedad varíe en ciertos momentos. Por lo cual se podría evaluar mantener cada unidad experimental de microinjerto en envases herméticos que mantengan saturada la humedad, especialmente en las primeras semanas, ya que la mortandad de los microinjertos se asoció a falta de humedad en este periodo.

Durante el cultivo en invernadero la temperatura fue de 22 a 30 °C, hasta el día 260, en el cual no se reportó mortandad y se pudieron diferenciar los microinjertos en los tipos “exitosos”, “probablemente exitosos” y los “no exitosos”. Esto está asociado al hecho que los injertos alcanzan un grado de madurez y adaptación a las condiciones externas;

sumado a que bajo luz natural se obtiene un mejor desarrollo (en peso fresco y diámetro) de plántulas de *Melocactus* spp. (Santos *et al.* 2020).

6.2.2 Tamaño del microinjerto y portainjerto

El tamaño de un microinjerto es de pocos milímetros, y el éxito de su establecimiento va a depender del material disponible, tiempo de cultivo y tipo de corte realizado (Navarro *et al.* 1975; Chilukamarri *et al.* 2021). En cactáceas, el microinjerto puede ser una plántula, tejido propagado *in vitro* o brotes de una planta madre; además su disponibilidad va a determinar la técnica y número de repeticiones a emplear, mientras que el portainjerto es de rápido crecimiento y de propagación controlable (Estrada-Luna *et al.* 2002; Moghadam *et al.* 2012; Park *et al.* 2012; Badalamenti *et al.* 2016).

Se han encontrado reportes de microinjertos de plántulas de *Notocactus* spp. de 2 mm y como portainjertos tallos enraizados de 10 cm de *Hylocereus trigonus* (Shimomura & Fujihara 1978). En microinjertos *in vitro* de *Opuntia* spp. el portainjerto y microinjerto fueron de diámetro similar, y 10 y 5 mm de largo, respectivamente, (Estrada-Luna *et al.* 2002). En otro caso, se usaron plántulas de *O. robusta* como microinjerto y tallos de seis meses y aproximadamente 8 cm de largo como portainjertos (Reyes 2019), por lo cual las medidas del microinjerto y portainjerto no son definidos, sino que dependen del material vegetal disponible a estudiar.

En este experimento, los microinjertos fueron plántulas de *M. bellavistensis* de 84 días y de aproximadamente 2 mm de largo y diámetro. Los portainjertos fueron tallos de *Pereskiopsis* sp. con cerca de 5 mm de diámetro y *Opuntia* sp. con superficie transversal aproximada de 1 x 5 cm, ambos portainjertos, con aproximadamente 10 cm de largo, formaban nuevos brotes ocasionalmente (los que eran retirados), lo que indicaba que presentaban un metabolismo activo. Si bien mantener las plántulas en cultivo por más meses podría aumentar el volumen de los microinjertos, esto postergaría la fecha de

microinjertado, y esos meses podrían corresponder al tiempo de adaptación e inicio de desarrollo del microinjerto.

En el caso de *Pereskiopsis* sp. su diámetro permite el microinjertado de una sola plántula, pero permite mantener más tallos en una misma unidad experimental, e inclusive se podría probar con tallos más cortos de 5 cm. Mientras que en *Opuntia* sp. se puede probar injertar más plántulas a la vez sobre el mismo portainjerto, pero con solo un portainjerto por unidad experimental. Ambos portainjertos tienen la característica de poder propagarse en alta densidad (por su diámetro reducido), a diferencia de portainjertos como *Hylocereus* sp. y *Echinopsis pachanoi*.

6.2.3 Desarrollo del microinjerto de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp.

Los cactus ornamentales, como *Gymnocalycium* sp. o *Schlumbergera* sp. se suelen injertar sobre *Echinopsis* sp. o *Hylocereus* sp., la unión de estos se da en las primeras dos semanas, y más que un ambiente con una elevada humedad, requieren mantener el contacto de las superficies del injerto y portainjerto; el desarrollo del injerto consiste en incrementar su volumen, generar nuevos tallos o hijuelos, y florecer, esto debido a que el injerto (hijuelo o tallo) ya han desarrollado una anatomía similar a la planta madre, como parénquima fotosintético y de reserva (Moghadam *et al.* 2012; Park *et al.* 2012; Melnyk 2017).

En la etapa inicial del microinjertado de plántulas (como las empleadas en este experimento), estas no presentan tejido de reserva o un metabolismo ya establecido y no se pueden sujetar al portainjerto, por lo cual al microinjertarlas presentan mayores dificultades para adaptarse, presentándose problemas de deshidratación, desprendimiento (por movimiento al trasladar la maceta, durante el riego o por la

formación de una nueva raíz), lentitud para retomar el crecimiento, formación de callo en la unión con el portainjerto, entre otros. Adicionalmente, su reducido tamaño y alta concentración de agua la hace más vulnerable a insectos, p. ej. trips. Estas dificultades podrían ser la causa de que coleccionistas suelen emplear esta técnica de propagación de forma anecdótica, pero sin reportar porcentajes de éxito, registro del proceso de crecimiento u otros.

Sin embargo, las plántulas microinjertadas tienen la ventaja que al crecer y desarrollarse se adaptarán mejor al cultivo en condiciones distintas a su hábitat, a diferencia de si se injertaran plántulas colectadas de campo.

Teniendo como base microinjertos de *Opuntia* spp. sobre *Opuntia* spp., Estrada-Luna *et al.* (2002) proponen cinco etapas para la formación de unión entre el injerto y portainjerto; sobre esta base se describió el desarrollo de los microinjertos de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp.

La **primera** etapa, desarrollo de una capa necrótica en el área de contacto, se dio en los primeros días, y no se pudo distinguir en este experimento.

Hasta el día 30 después de microinjertado, se dio el establecimiento de un tejido de conexión entre el microinjerto de *M. bellavistensis* con su portainjerto, esto se comprueba al observar que durante estos días es cuando ocurren las muertes por deshidratación y desprendimientos, sea porque el microinjerto desarrolla una nueva raíz o a causa de un movimiento brusco al mover las macetas. Mientras que los microinjertos que lograron formar el tejido de conexión en el área de contacto con el portainjerto tienen una fuente de agua y se mantienen turgentes; esto correspondería a la **segunda** etapa propuesta por Estrada-Luna *et al.* (2002).

Al día 90, presentan un ligero crecimiento y aparecen nuevas espinas cortas y frágiles. Sin embargo, aún no se pueden distinguir los “microinjertos exitosos”, “probablemente exitosos” y “no exitosos”.

Al día 120 se pueden distinguir los microinjertos “no exitosos” porque no generan nuevas espinas ni incrementan su tamaño, se puede inferir que solo llegaron a la **segunda** etapa (formar un callo en la zona de unión). Mientras que los demás microinjertos aumentan de tamaño, generan nuevas espinas y se definen las areolas; por lo que se encontrarían en la formación de nuevos haces vasculares que conecten al microinjerto y portainjerto; **tercera** etapa propuesta por Estrada-Luna *et al.* (2002).

Al día 260 se pueden distinguir los “microinjertos exitosos” de los microinjertos “probablemente exitosos”, los primeros completaron la restauración de tejido vascular (**cuarta** etapa) por lo que pueden recibir más agua y nutrientes provenientes del portainjerto; los últimos pueden seguir en la formación de un nuevo cambium vascular (**tercera** etapa). Los “microinjertos exitosos” se reconocen principalmente por el desarrollo de tejido fotosintético y por la distinción de costillas con tres o más areolas, adicionalmente se observa aumento de tamaño y espinas nuevas largas marrones a rojizas.

La **quinta etapa** no se aplica ya que los microinjertos son globosos y los portainjertos cilíndricos, por lo que se distingue claramente la zona de unión.

Con base en los microinjertos evaluados, se identificaron **cuatro etapas de desarrollo** del “microinjerto exitoso”.

1. Establecimiento de unión o conexión tisular entre el microinjerto y portainjerto; se da en los primeros 30 días, permite mantener hidratado al microinjerto.

2. Desarrollo de unión microinjerto - portainjerto; se da un ligero crecimiento, cambio de coloración, se forman nuevas espinas y se distinguen areolas. Se da hasta aprox. el día 120.

3. Reactivación de metabolismo; el microinjerto desarrolla tejido fotosintético y se pueden distinguir costillas con tres o más areolas, además de espinas nuevas de mayor tamaño y crecimiento del microinjerto. En este punto se considera que el microinjerto fue exitoso. Se registró en el día 150. Con base en las pruebas preliminares esta etapa puede durar varias semanas o meses, en especial si la temperatura desciende.

4. Crecimiento sostenido: se da por varios meses. Se ha observado en las pruebas preliminares, al retomar temperaturas medias de más de 23 °C.

Se debe considerar que la estación del año influye en la temperatura media, y con esto en el desarrollo y crecimiento de microinjertos, ralentizándose durante el otoño e invierno (Bayat *et al.* 2016).

Si bien esta identificación de etapas de desarrollo se basa en microinjertos de *Melocactus bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp., se pueden emplear de guía para evaluar plántulas microinjertadas de otras especies. En especial de especies peruanas que requieren de propagación *ex situ* para su conservación y estudio, ya que la mayoría de estudios de injertos y microinjertos de cactáceas se han enfocado en especies de interés comercial (Estrada-Luna *et al.* 2002; Moghadam *et al.* 2012; Hong *et al.* 2018; Kamalzade *et al.* 2021).

Además, al reportar y definir un microinjerto exitoso, probablemente exitoso y no exitoso, en *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp. como portainjertos, los tiempos de desarrollo y el seguimiento de estos, se completa un vacío de información pendiente, ya que se suele reportar los casos exitosos de microinjertar, pero no el proceso.

6.2.4 Crecimiento, en diámetro y altura, del microinjerto de *M. bellavistensis* sobre *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp.

Las plántulas de *M. bellavistensis* que se microinjertaron tenían 84 días de cultivo, 2.34 ± 0.26 y 2.60 ± 0.4 mm de diámetro y altura, respectivamente. Y para los microinjertos se consideró diámetro y altura inicial de 2 mm.

Para *M. zehntneri*, *M. violaceus* y *M. sergipensis*, plántulas de 60 días germinadas *in vitro* en invernadero o con luz artificial tenían diámetros de 2.0 a 2.67 mm, similar a *M. bellavistensis*; y luego de 60 días de cultivo en invernadero, sembradas en arena: humus 1:1, el diámetro para las tres especies germinadas en invernadero fue de 4.45, 3.9 y 6.19 mm, respectivamente, mientras que las germinadas en luz artificial fue de 1.51, 3.15 y 3.59 mm, respectivamente, y la altura para las tres especies fue aproximadamente de 6, 8 y 10 mm (Santos *et al.* 2020). En este caso, el traslado de plántulas a cultivo en sustrato y luz natural tendió a incrementar el diámetro y altura, mientras que al microinjertar se somete a las plántulas a estrés hídrico y fisiológico (porque se expone a la deshidratación por el corte y requieren adaptarse a la pérdida de raíz) y el crecimiento se ralentiza mientras se adapta fisiológicamente al portainjerto y, con base en las pruebas preliminares, se espera que los microinjertos exitosos superen el crecimiento a las plántulas mantenidas en sustrato.

Además, el crecimiento promedio de todos los microinjertos (exitosos, probablemente exitosos y no exitosos) fue sostenido durante todo el experimento (Figs. 26 y 27), llegando a duplicar su diámetro y altura inicial.

6.2.5 Diversidad para restauración, cultivo *in vitro* y reguladores de crecimiento

Uno de los objetivos de este trabajo es apoyar la propagación *ex situ* de cactáceas para conservación, y para ello se requiere mantener la diversidad genética de la población de la cual se colectó el material vegetal inicial (en este caso, mediante la propagación

por semillas). Ya sea que se quiera propagar y mantener una población que está próxima a desaparecer, o si se plantea trabajos de repoblamiento.

En el caso de restaurar poblaciones de especies en peligro es importante mantener la variabilidad genética para asegurar su sobrevivencia y desarrollo a largo plazo (Rubluo *et al.* 1993).

El cultivo *in vitro* de tejidos es una herramienta promocionada por la capacidad de producir un gran número de individuos; sin embargo, una desventaja propia de esta técnica es que al ser una propagación clonal no genera diversidad genética; además, puede causar cierta variabilidad somaclonal como lo reportado para *Coryphantha minima* y *Obregonia denegrii* (Malda *et al.* 1999); o en *Melocactus glaucescens* donde se detectaron variaciones genéticas cuando no se usaron reguladores de crecimiento, y en algunas combinaciones de 6-bencilaminopurina y ácido naftalenacético se observaron variaciones morfológicas en la forma del cladodio, patrón de espinas e hiperhidrosis, las cuales no se observaron cuando se aplicó kinetina y ácido naftalenacético (Torres-Silva *et al.* 2018). Por lo cual, la propagación *in vitro* se recomienda especialmente para suplir la demanda comercial cactáceas (Song *et al.* 2021).

Por otro lado, el uso de reguladores de crecimiento podría mejorar la efectividad de la técnica de microinjertado, como la aplicación de 5 µL de 100 ppm de 1-ácido naftalenacético sobre el microinjerto *Notocactus submammulosus,* el cual registró un incremento de la formación de conexiones vasculares entre un 90 a 100 % al aplicarse a los 3, 6 y 9 días después de injertar, y disminuyendo hasta 47 y 18% al aplicarse después de 20 y 40 días respectivamente, cuando se injertó sobre *Hylocereus trigonus* (Shimomura & Fujihara 1978).

Por el momento se desconoce el efecto que pudieran tener estas variaciones en las plantas propagadas, por lo cual en este trabajo se decidió no emplear reguladores de crecimiento.

6.3 Dificultades y consideraciones durante el mantenimiento del experimento

Para cada lugar donde se aplique la técnica de microinjertado, se requiere considerar la temperatura promedio en las estaciones, siendo más favorable las temporadas con temperatura promedio mayor a 20 °C, ya que es cuando las cactáceas (como las empleadas en esta tesis) presentan un metabolismo activo.

Durante la propagación de portainjertos se debe vigilar y evitar la presencia de parásitos como trips, cochinilla, arañita roja y orugas, ya que afectan el crecimiento y formación de nuevos brotes de los portainjertos, y además pueden permanecer hasta la etapa de microinjertado, donde los microinjertos son más vulnerables. Esto se puede prevenir lavando y desinfectando los portainjertos antes de iniciar su propagación, eliminando los que tengan signo de enfermedades o parásitos, y aplicando insecticidas (a la mitad de la concentración recomendada) de forma preventiva y antes de microinjertar (Vargas G. & López M. 2020).

7 CONCLUSIONES

1. Se obtuvo más del 85% de germinación al evaluar temperaturas mayores a 20 °C con fotoperiodo de 12 horas.

2. El tipo de luz (natural, artificial o mixta) influye en el porcentaje de germinación y en las características de altura, coloración y vigor de las plántulas.

3. La obtención de plántulas apropiadas para microinjertar se debe priorizar sobre la obtención de altos porcentajes de germinación, requiriéndose optimización para cada especie.

4. El empleo de tallos o cladodios jóvenes de *Pereskiopsis* sp. y *Opuntia* sp. como portainjertos, permiten acelerar el desarrollo de plántulas de *M. bellavistensis* microinjertadas.

8 RECOMENDACIONES

1. Evaluar otros portainjertos como plántulas de *Opuntia ficus-indica*, *Hylocereus* sp. u otros cultivares de rápido crecimiento.

2. Adaptar la técnica de microinjertado de plántulas para especies raras o de distribución restringida, sobre todo si se busca mantener la densidad poblacional con diversidad genética.

3. Para reintroducción, se requiere estudios de aclimatación de plantas obtenidas a partir de microinjertos.

9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, E.F., 2001. *The Cactus Family*. S.l.: Timber Press. ISBN 978-0-88192-498-5.

ANGULO-BEJARANO, P.I. y PAREDES-LÓPEZ, O., 2011. Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus (Opuntia ficus-indica (L.) Mill). *Scientia Horticulturae*, vol. 128, no. 3, pp. 283-288. ISSN 0304-4238.

ARAKAKI, M., OSTOLAZA, C., CÁCERES, F. y ROQUE, J., 2006. Cactaceae endémicas del Perú. [en línea], pp. 193s-219s. [Consulta: 1 octubre 2019]. ISSN 1727-9933.

BACKEBERG, C., 1934. *Blätter für Kakteenforschung* [en línea]. C. Backeberg. Volksdorf Bez. Hmb. Deutchland: s.n. [Consulta: 13 mayo 2020]. Disponible en: https://www.cactuspro.com/lecture/Backeberg-Curt/Blatter-fur-Kakteenforschung/page-112.en.html.

BACKEBERG, C., 1976. *Cactus Lexicon* [en línea]. 3er. S.l.: Blandford Press Ltd.[Consulta: 13 mayo 2020]. ISBN 0 7137 0840 9.

BADALAMENTI, O., CARRA, A., ODDO, E., CARIMI, F. y SAJEVA, M., 2016. Is in vitro micrografting a possible valid alternative to traditional micropropagation in Cactaceae? Pelecyphora aselliformis as a case study. *SpringerPlus*, vol. 5, no. 1, pp. 201. ISSN 2193-1801.

BARTHLOTT, W. y HUNT, D.R., 1993. Cactaceae. En: K. KUBITZKI, J.G. ROHWER y V. BITTRICH (eds.), *Flowering Plants · Dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families* [en línea]. Berlin, Heidelberg: Springer, The Families

and Genera of Vascular Plants, pp. 161-197. [Consulta: 30 marzo 2020]. ISBN 978-3-662-02899-5.

BASIUK, V.A., 2013. Teratopia in Cactaceae Family: The Effect of Temperature. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, vol. 5, no. 4, pp. 377-383.

BAYAT, N., NADERI, R. y MAIDANI, A.R., 2016. Does grafting time affect the cactus performance? En: Accepted: 2021-04-13T10:51:04Z [en línea], [Consulta: 20 diciembre 2021]. ISSN 1307-9530.

BHAU, B.S. y WAKHLU, A.K., 2015. A highly efficient in vitro propagation protocol for elephant tusk cactus: Coryphantha elephantidens (Lem.) Lem. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, vol. 13, no. 2, pp. 215-219. ISSN 1687-157X.

BRESLIN, P.B., WOJCIECHOWSKI, M.F. y ALBUQUERQUE, F., 2020. Projected climate change threatens significant range contraction of Cochemiea halei (Cactaceae), an island endemic, serpentine-adapted plant species at risk of extinction. *Ecology and Evolution*, vol. 10, no. 23, pp. 13211-13224. ISSN 2045-7758.

CASTRO CEPERO, V., EYZAGUIRRE PÉREZ, R. y CERONI STUVA, A., 2006. Supervivencia de plántulas de Melocactus peruvianus Vaupel y Haageocereus pseudomelanostele subsp. aureispinus (Rauh & Backeberg) Ostolaza, en condiciones experimentales. Cerro Umarcata, Valle del Río Chillón, Lima. *Ecología Aplicada* [en línea], vol. 5, no. 1-2, pp. 61-66. [Consulta: 27 agosto 2019]. ISSN 1726-2216.

CENTENO-ALVARADO, D., SILVA, J.L.S., CRUZ-NETO, O. y LOPES, A.V., 2022. Climate change may reduce suitable habitats for Tacinga palmadora (Cactaceae) in the Caatinga dry forest: species distribution modeling considering plant-pollinator interactions. *Regional Environmental Change*, vol. 22, no. 1, pp. 16. ISSN 1436-378X.

CHILUKAMARRI, L., ASHRAFZADEH, S. y LEUNG, D.W.M., 2021. In-vitro grafting – Current applications and future prospects. *Scientia Horticulturae*, vol. 280, pp. 109899. ISSN 0304-4238.

CIVATTI, L.M., MARCHI, M.N.G. y BELLINTANI, M.C., 2017. Micropropagation of two species of Micranthocereus (Cactaceae) with ornamental potential native to Bahia, Brazil. *African Journal of Biotechnology*, vol. 16, no. 14, pp. 749-762. ISSN 1684-5315.

CONEJERO, A., ROMERO, C., CUNILL, M., MESTRE, M.A., MARTÍNEZ-CALVO, J., BADENES, M.L. y LLÁCER, G., 2013. In vitro shoot-tip grafting for safe Prunus budwood exchange. *Scientia Horticulturae* [en línea], vol. 150, pp. 365-370. [Consulta: 20 septiembre 2019]. ISSN 0304-4238.

CÓRDOVA-RISCO, J., ROJAS-IDROGO, C. y DELGADO-PAREDES, G.E., 2017. In vitro micrografting of lucumo (Pouteria lucuma), Sapotaceae. *Environmental and Experimental Biology* [en línea], [Consulta: 9 septiembre 2019]. ISSN 22559582.

CORTIZO, M., ALONSO, P., FERNÁNDEZ, B., RODRÍGUEZ, A., CENTENO, M.L. y ORDÁS, R.J., 2004. Micrografting of mature stone pine (Pinus pinea L.) trees. *Annals of Forest Science* [en línea], vol. 61, no. 8, pp. 843-845. [Consulta: 9 septiembre 2019]. ISSN 1286-4560, 1297-966X.

DI RIENZO J.A., CASANOVES F., BALZARINI M.G., GONZALEZ L., TABLADA M. y ROBLEDO C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar

EDRISS, M.H. y BURGER, D.W., 1984. Micro-grafting shoot-tip culture of citrus on three trifoliolate rootstocks. *Scientia Horticulturae* [en línea], vol. 23, no. 3, pp. 255-259. [Consulta: 11 septiembre 2019]. ISSN 0304-4238.

EL FINTI, A., EL BOULLANI, R., AIT AABDABD, N., MSANDA, F., A. SERGHINI, M. y EL MOUSADIK, A., 2013. In Vitro Propagation of Three Moroccan Prickly Pear Cactus Opuntia and Plant Establishment in Soil. *Notulae Scientia Biologicae*, vol. 5, no. 1, pp. 39-44. ISSN 2067-3205.

ESTRADA-LUNA, A.A., LÓPEZ-PERALTA, C. y CÁRDENAS-SORIANO, E., 2002. In vitro micrografting and the histology of graft union formation of selected species of prickly pear cactus (Opuntia spp.). *Scientia Horticulturae* [en línea], vol. 92, no. 3, pp. 317-327. [Consulta: 29 agosto 2019]. ISSN 0304-4238.

ESTRADA-LUNA, A.A., MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, J. de J., TORRES-TORRES, M.E. y CHABLÉ-MORENO, F., 2008. In vitro micropropagation of the ornamental prickly pear cactus Opuntia lanigera Salm–Dyck and effects of sprayed GA3 after transplantation to ex vitro conditions. *Scientia Horticulturae*, vol. 117, no. 4, pp. 378-385. ISSN 0304-4238.

FERNÁNDEZ ALONSO, J.L. y XHONNEUX, G., 2002. Novedades taxonómicas y sinopsis del género Melocactus Link & Otto(Cactaceae) en Colombia. En: Accepted: 2011-03-07T08:54:57Z [en línea], [Consulta: 29 mayo 2021]. ISSN 0370-3908.

FEUCHT, W., 1988. GRAFT INCOMPATIBILITY OF TREE CROPS: AN OVERVIEW OF THE PRESENT SCIENTIFIC STATUS. *Acta Horticulturae* [en línea], no. 227, pp. 33-42. [Consulta: 20 septiembre 2019]. ISSN 0567-7572, 2406-6168.

GIUSTI, P., VITTI, D., FIOCCHETTI, F., COLLA, G., SACCARDO, F. y TUCCI, M., 2002. In vitro propagation of three endangered cactus species. *Scientia Horticulturae*, vol. 95, no. 4, pp. 319-332. ISSN 0304-4238.

GOETTSCH, B., HILTON-TAYLOR, C., CRUZ-PIÑÓN, G., *et al.*, 2015. High proportion of cactus species threatened with extinction. *Nature Plants*, vol. 1, no. 10, pp. 1-7. ISSN 2055-0278.

HONG, S.W., CHO, H.J., SHIM, C.K. y KWAK, Y.-S., 2018. Investigation of disease occurrences and rapid diagnosis in grafted cactus. *Journal of Plant Diseases and Protection*, vol. 125, no. 1, pp. 109-114. ISSN 1861-3837.

HUNT, D. y TAYLOR, N., 1990. The genera of Cactaceae: progress towards consensus. *Bradleya*, vol. 1990, no. 8, pp. 85-106. ISSN 0265-086X.

HUNT, D.R., TAYLOR, N.P. y CHARLES, G., 2006. *The new cactus lexicon* [en línea]. S.l.: dh books. [Consulta: 7 junio 2022]. ISBN 978-0-9538134-4-5. D

IUCN, 2022. The IUCN Red List of Threatened Species. *IUCN Red List of Threatened Species* [en línea]. [Consulta: 9 marzo 2022]. Disponible en: https://www.iucnredlist.org/en.

JONARD, R., HUGARD, J., MACHEIX, J.-J., MARTINEZ, J., MOSELLA-CHANCEL, L., POESSEL, J.L. y VILLEMUR, P., 1983. In vitro micrografting and its applications to fruit science. *Scientia Horticulturae* [en línea], vol. 20, no. 2, pp. 147-159. [Consulta: 19 septiembre 2019]. ISSN 0304-4238.

KALAN, C., KALAN, C., AKBAS, F. y EROL AK, B., 2011. Micrografting of Almond (Amygdalus communis) Cultivar «Nonpareil». *Australian Journal of Crop Science* [en línea], vol. 5, no. 1, pp. 61. [Consulta: 19 septiembre 2019].

KAMALZADE, N., MIRI, S.M. y GHAZIJAHANI, N., 2021. Development of Graft Union Formation and Histological Observations in Cactus Influenced by Benzyladenine, Grafting Method and Rootstock. *Journal of Ornamental Plants*, vol. 11, no. 1, pp. 43-53. ISSN 2251-6433.

KOROTKOVA, N., AQUINO, D., ARIAS, S., EGGLI, U., FRANCK, A., GÓMEZ-HINOSTROSA, C., GUERRERO, P.C., HERNÁNDEZ, H.M., KOHLBECKER, A., KÖHLER, M., LUTHER, K., MAJURE, L.C., MÜLLER, A., METZING, D., NYFFELER, R., SÁNCHEZ, D., SCHLUMPBERGER, B. y BERENDSOHN, W.G., 2021. Cactaceae at Caryophyllales.org – a dynamic online species-level taxonomic backbone for the family. *Willdenowia*, vol. 51, no. 2, pp. 251-270. ISSN 0511-9618, 1868-6397.

LONE, A.B., TAKAHASHI, L.S.A., FARIA, R.T. de y UNEMOTO, L.K., 2007. GERMINAÇÃO DE Melocactus bahiensis (CACTACEAE) EM DIFERENTES SUBSTRATOS E TEMPERATURAS. *Scientia Agraria* [en línea], vol. 8, no. 4, pp. 365-369. [Consulta: 27 agosto 2019]. ISSN 1983-2443.

MALDA, G., SUZÁN, H. y BACKHAUS, R., 1999. In vitro culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulacean acid metabolism. *Scientia Horticulturae*, vol. 81, no. 1, pp. 71-87. ISSN 0304-4238.

MATERÁN, M.E., VEGA, M.C., SÁNCHEZ-OLATE, M., SÁEZ, K., RODRÍGUEZ, R. y RÍOS, D., 2008. Reactivación de material vegetal élite de pinus radiata d. Don.

Mediante microinjerto in vitro. *Interciencia* [en línea], vol. 33, no. 1, pp. 66-70. [Consulta: 9 septiembre 2019]. ISSN 0378-1844.

MELNYK, C.W., 2017. Plant grafting: insights into tissue regeneration. *Regeneration*, vol. 4, no. 1, pp. 3-14. ISSN 2052-4412.

MOGHADAM, A.R.L., ARDEBILI, Z.O. y REZAIE, L., 2012. Effect of indole butyric acid on micrografting of cactus. *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, no. 24, pp. 6484-6493. ISSN 1684-5315.

MOHAMED-YASSEEN, Y., 2002. Micropropagation of pitaya (Hylocereus undatus Britton et rose). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, vol. 38, no. 5, pp. 427-429. ISSN 1475-2689.

MONDAL, T., PARATHI, R. y MOHANKUMAR, P., 2005. Micrografting-a technique to shorten the hardening time of micropropagated shoots of tea (Camellia sinensis (L.) O. Kuntze). *Sri Lank J Tea Sci*, vol. 70, pp. 5-9.

NAVARRO, L., ROISTACHER, C.N. y MURASHIGE, T., 1975. Improvement of shoot-tip grafting in vitro for virus-free citrus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, vol. 100, pp. 471-479.

NYFFELER, R. y EGGLI, U., 2010. A farewell to dated ideas and concepts: molecular phylogenetics and a revised suprageneric classification of the family Cactaceae. *Schumannia* [en línea], vol. 6, pp. 109-149. [Consulta: 18 febrero 2020]. ISSN 1437-2517.

OLDFIELD, S., 1997. *Cactus and Succulent Plants: Status Survey and Conservation Action Plan*. S.l.: IUCN. ISBN 978-2-8317-0390-9.

OSTOLAZA, C., 2019. *Todos los cactus del Perú* [en línea]. primera. Lima. Perú: EDITORIAL FRANCO EIRL. ISBN 978-612-4174-16-2.

PADILLA, I.M.G. y ENCINA, C.L., 2011. The use of consecutive micrografting improves micropropagation of cherimoya (Annona cherimola Mill.) cultivars. *Scientia Horticulturae* [en línea], vol. 129, no. 1, pp. 167-169. [Consulta: 20 septiembre 2019]. ISSN 0304-4238.

PARK, P.-M., JEONG, M.-I., YAE, B.-W., KIM, M.-S., LEE, Y.-R., PARK, P.-H. y YOO, B.-S., 2012. A New Grafted Cactus with Bright Yellow Color, «Hwangseon». *Horticultural Science & Technology*, vol. 30, no. 3, pp. 342-344. ISSN 1226-8763.

PRAKASH, O.K.S., SOOD, A., SHARMA, M. y AHUJA, P.S., 1999. Grafting micropropagated tea [Camellia sinensis (L.) O. Kuntze] shoots on tea seedlings – a new approach to tea propagation. *Plant Cell Reports*, vol. 18, pp. 883-888.

REBOUÇAS, A.C.M.N. y SANTOS, D.L., 2008. Influência do Fotoperíodo e Qualidade de Luz na Germinação de Sementes de Melocactus conoideus (Cactaceae). *Revista Brasileira de Biociências* [en línea], vol. 5, no. S2, pp. 900-902. [Consulta: 27 agosto 2019]. ISSN 1980-4849.

RETES-PRUNEDA, J.L., VALADEZ-AGUILAR, M. de L., PÉREZ-REYES, M.E. y PÉREZ-MOLPHE-BALCH, E., 2007. Propagación in vitro de especies de Echinocereus, Escontria, Mammillaria, Melocactus y Polaskia (Cactaceae). *Botanical Sciences*, no. 81, pp. 9-16. ISSN 2007-4476.

REYES HERRERA, P., 2019. *Injertos y reguladores de crecimiento en tres cactáceas endémicas de México.* [en línea]. Tesis de Maestría. Montecillo, Texcoco, Edo.

de Mexico: COLEGIO DE POSTGRADUADOS. [Consulta: 12 enero 2022]. Disponible en: http://localhost:8080/xmlui/handle/10521/3899.

RUBLUO, A., CHÁVEZ, V., MARTÍNEZ, A.P. y MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, O., 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through in-vitro culture. *Biological Conservation*, vol. 63, no. 2, pp. 163-169. ISSN 0006-3207.

SALAZAR, C.R.L., MOLINA-MOREIRA, N., SALAZAR, C.R.L. y MOLINA-MOREIRA, N., 2019. Nuevo registro de Melocactus peruvianus (Cactaceae) y estado de conservación del género Melocactus en el Ecuador. *Rodriguésia* [en línea], vol. 70. [Consulta: 3 enero 2020]. ISSN 2175-7860.

SANTOS, P.A.A., SILVA, L.C., MENDONÇA, A.M. das C., DIAS, G. da S., DE FARIAS, A.S., DAMASCENO, S.A., BRAVO FILHO, E.S. y SANTANA, M.C. de, 2020. Do different cultivation environments influence the germination and initial growth of three threatened Brazilian cacti species? *South African Journal of Botany*, vol. 132, pp. 363-370. ISSN 0254-6299.

SANTOS-DÍAZ, M. del S., SANTOS-DÍAZ, Ma. de L. y ALVARADO-RODRÍGUEZ, J., 2022. In vitro regeneration of the endangered cactus Turbincarpus mombergeri (Riha), a hybrid of T. laui × T. pseudopectinatus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, vol. 148, no. 2, pp. 271-279. ISSN 1573-5044.

SHIMOMURA, T. y FUJIHARA, K., 1976. Histological Observations on Graft Union Formation in Cactus. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* [en línea], vol. 44, no. 4, pp. 402-408. [Consulta: 20 septiembre 2019]. ISSN 0013-7626, 1880-358X.

SHIMOMURA, T. y FUJIHARA, K., 1978. Prevention of auxin-induced vascular differentiation in wound callus by surface-to-surface adhesion between calluses of stock and scion in cactus grafts. *Plant and Cell Physiology* [en línea], vol. 19, no. 5, pp. 877-886. [Consulta: 20 septiembre 2019]. ISSN 0032-0781.

SONG, K., KANG, H., AK, G., ZENGIN, G., CZIÁKY, Z., JEKŐ, J., KIM, D.H., LEE, O.N. y SIVANESAN, I., 2021. Micropropagation, phytochemistry and biological activity of the critically endangered Mammillaria herrerae Werdermann. *South African Journal of Botany*, vol. 143, pp. 312-321. ISSN 0254-6299.

TAYLOR, N.P., 1991. The genus Melocactus (Cactaceae) in Central and South America. *Bradleya*, vol. 1991, no. 9, pp. 1-80. ISSN 0265-086X.

TOMAZ DE OLIVEIRA, M.M., LU, S., ZURGIL, U., RAVEH, E. y TEL-ZUR, N., 2021. Grafting in Hylocereus (Cactaceae) as a tool for strengthening tolerance to high temperature stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, vol. 160, pp. 94-105. ISSN 0981-9428.

TORRES-SILVA, G., RESENDE, S.V., LIMA-BRITO, A., BEZERRA, H.B., DE SANTANA, J.R.F. y SCHNADELBACH, A.S., 2018. In vitro shoot production, morphological alterations and genetic instability of Melocactus glaucescens (Cactaceae), an endangered species endemic to eastern Brazil. *South African Journal of Botany*, vol. 115, pp. 100-107. ISSN 0254-6299.

VARGAS G., K.A. y LÓPEZ M., R.N., 2020. *Guía Técnica del cultivo de pitahaya (Hylocereus megalanthus) en la región Amazonas* [en línea]. S.l.: Instituto Nacional de Innovación Agraria - INIA. [Consulta: 17 septiembre 2022]. ISBN 978-9972-44-046-5. Disponible en: https://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/1052.

WITTNER, H., 2019. News from the regions of Cajamarca and Amazonas in northern Peru. [en línea], vol. 24, pp. 49-60. ISSN 2048-0482. Disponible en: http://www.cactusexplorers.org.uk/Explorer24/Cactus%20Explorer%2024_complete.pdf.

WU, H.C., DU TOIT, E.S. y REINHARDT, C.F., 2007. Micrografting of Protea cynaroides. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* [en línea], vol. 89, no. 1, pp. 23-28. [Consulta: 20 septiembre 2019]. ISSN 1573-5044.

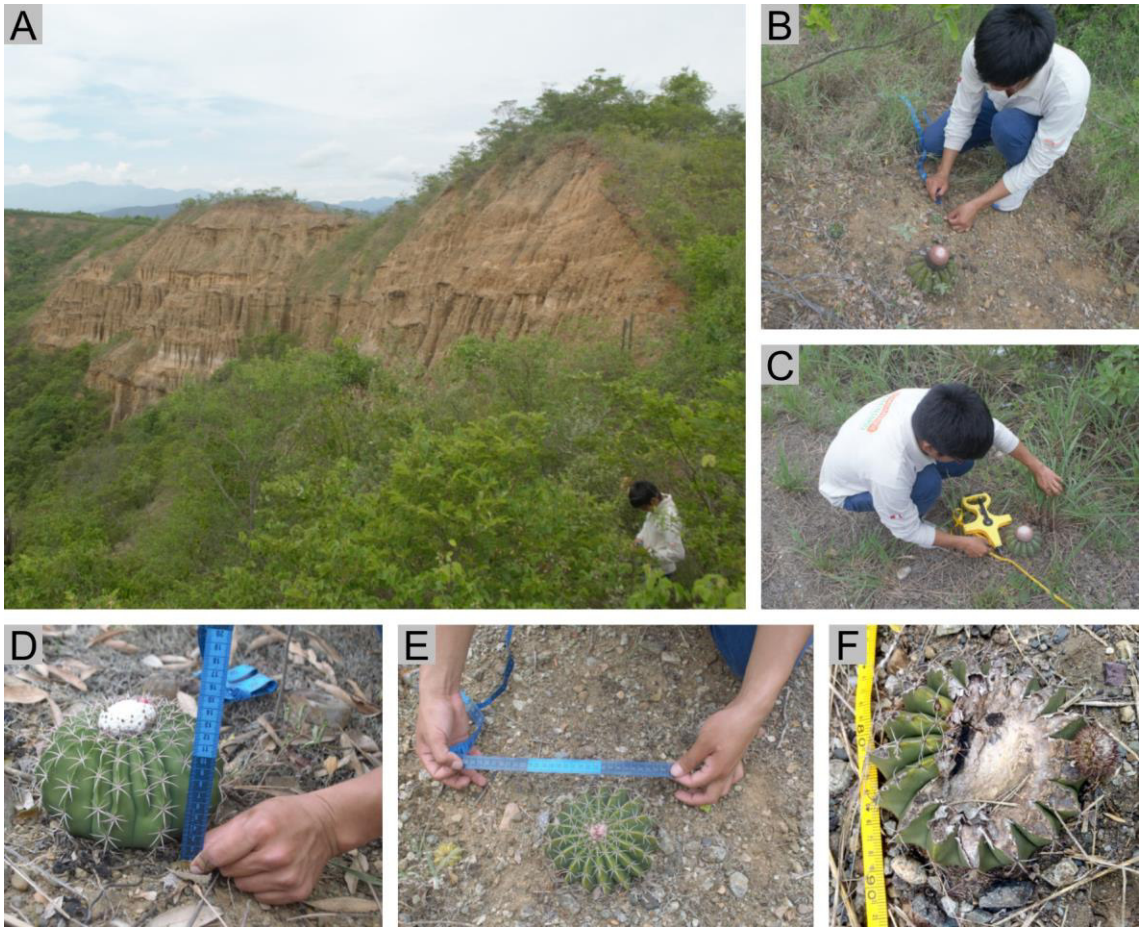
WYKA, T.P., 2007. In Vitro Reversion Of Cephalial Tissue To Vegetative Growth In Melocactus matanzanus. *Haseltonia*, vol. 2008, no. 14, pp. 185-188. ISSN 1070-0048, 1938-2898.

YEOMAN, M.M. y BROWN, R., 1976. Implications of the Formation of the Graft Union for Organisation in the Intact Plant. *Annals of Botany* [en línea], vol. 40, no. 6, pp. 1265-1276. [Consulta: 20 septiembre 2019]. ISSN 0305-7364.

ZAMITH, L.R., CRUZ, D.D. y RICHERS, B.T.T., 2013. The effect of temperature on the germination of Melocactus violaceus Pfeiff. (Cactaceae), a threatened species in restinga sandy coastal plain of Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* [en línea], vol. 85, no. 2, pp. 615-622. [Consulta: 27 agosto 2019]. ISSN 0001-3765.

10 ANEXOS

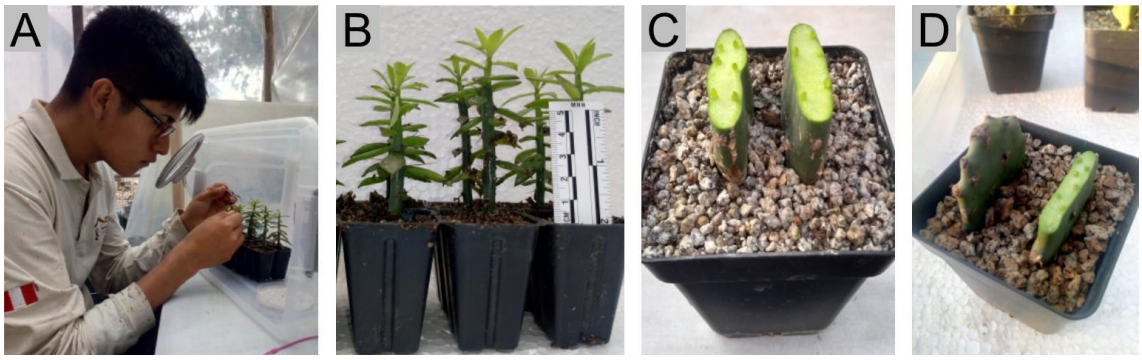
Anexo 1. Evaluación de población de *Melocactus bellavistensis*, en localidad tipo (distrito Bellavista, provincia Jaén, departamento de Cajamarca). A. Hábitat afectado por extracción de suelo. B-E. Evaluación de individuos saludables. F. Individuo en recuperación.



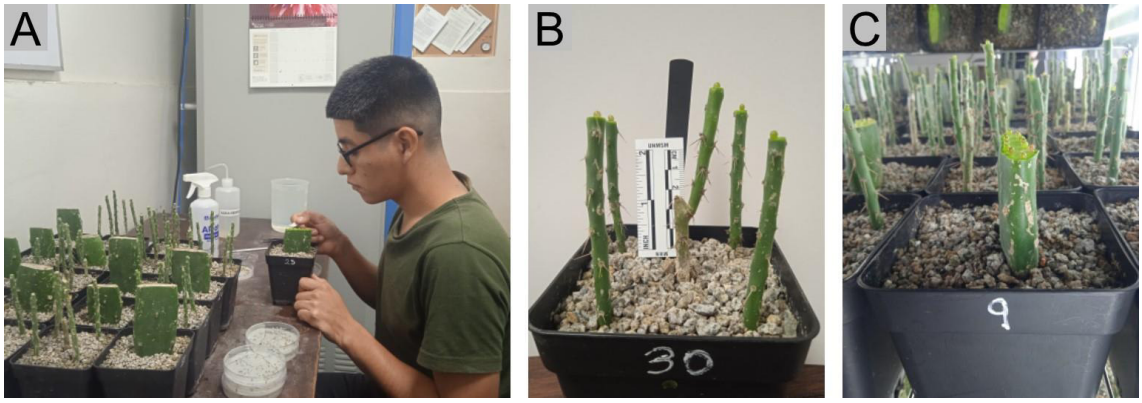
Anexo 2. Amenazas a poblaciones de cactáceas por comercio ornamental, Lima 2022. A. Comercio ambulatorio. B-C. Individuos juveniles de *Oroya* sp. *Melocactus* sp. y *Echinopsis* sp. C. D-E. Individuos adultos de *Oroya* sp. y *Melocactus* sp.



Anexo 3. Pruebas preliminares de microinjertado de plántulas. A-B. En *Pereskiopsis* sp. como portainjertos. C-D. En dos tipos de *Opuntia* spp. como portainjertos.



Anexo 4. Día de inicio de experimento. A. Microinjertado de plántulas de *Melocactus bellavistensis*. B. Unidad experimental de *Pereskiopsis* sp. C. Unidad experimental de *Opuntia* sp.



Anexo 5. Mantenimiento de microinjertos en invernadero. A. Evaluación de diámetro y altura de microinjertos. B. Microinjertos exitoso de *Opuntia* sp. C. Ensayos de plántulas de *Hylocereus* sp. como portainjertos de *M. bellavistensis*. D. Invernadero en Museo de Historia Natural. E. Microinjertos de *M. bellavistensis* sobre Pereskiopsis sp.

